

Untersuchungen über die
ernährungshygienische Unbedenklichkeit des Einsatzes
der Coccidiostatica Nitrofurazon, Nitrophenid
und Nicarbazin in Geflügelmischfuttern
unter besonderer Berücksichtigung der Verwendung
von Nicarbazin

Edmund Schwarz

=
1961

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr. Johs. Brüggemann

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ERNÄHRUNGSHYGIENISCHE UN-
BEDENKLICHKEIT DES EINSATZES DER COCCIDIOSTATICA
NITROFURAZON, NITROPHENID UND NICARBAZIN
IN GEFLÜGELMISCHFUTTERN
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER VERWENDUNG
VON NICARBAZIN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Edmund S c h w a r z
aus
Salching
1961

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. A. Meyn

Referent: Professor Dr. Dr. Johs. Brüggemann

Tag der Promotion: 26. Juli 1961



In Dankbarkeit
meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Literatur	2
1. Nitrofurazon	2
2. Nitrophenid	4
3. Nicarbazin	6
C. Eigene Untersuchungen	11
I. Tierversuche	11
1 a) Anlage des Kükenversuches	11
b) Ergebnisse und Diskussion	14
α) Nitrofurazon	20
β) Nitrophenid	23
γ) Nicarbazin	24
2 a) Anlage des Junggeflügelversuches	24
b) Ergebnisse und Diskussion	26
α) Nitrofurazon	26
β) Nitrophenid	32
γ) Nicarbazin	34
II. Analytischer Teil	35
1. Auswahl der Tiere für die Analysen	35
2. Dinitrocarbanilidbestimmung	36
3. Bestimmung des Hydroxydimethylpyrimidins	41
4. Ergebnisse und Diskussion	43
5. Kühlschranks- und Gefrierversuche	50
6. Abbauprobieren mit Leber und Muskel	50
7. Bratversuche	51
D. Diskussionsbemerkungen zur Frage der hygienischen Unbedenklichkeit der Coccidiostaticaanwendung	52
E. Zusammenfassung	55
F. Literaturverzeichnis	56
G. Lebenslauf	61

A. EINLEITUNG

In der deutschen Landwirtschaft bahnt sich seit 1952 und besonders in den letzten 2 - 3 Jahren eine Entwicklung an, die der Geflügelhaltung größeres Augenmerk schenkt. Es gehen immer mehr Betriebe zur intensiven Geflügelhaltung über. Der Grund liegt einerseits im Stallpersonalmangel für Großtiere, andererseits im steigenden Bedarf und Verbrauch von Eiern und Geflügelfleisch.

Einen sehr großen Teil der Rente der Geflügelhaltung im bäuerlichen Betrieb beanspruchen die Aufzuchtverluste, vor allem die Coccidiose, die trotz Beachtung der gebräuchlichen hygienischen Vorsichtsmaßnahmen die Geflügelaufzucht mit einem größeren Risiko belastet. Zur Erzielung einer optimalen Wirtschaftlichkeit - insbesondere bei der Geflügelintensivhaltung - sind daher coccidiostatisch wirksame Verbindungen, die in den letzten Jahren von verschiedener Seite entwickelt wurden, von besonderer praktischer Bedeutung. Es handelt sich insbesondere um NITROFURAZON, NITROPHENID und NICARBAZIN, die in geringen Konzentrationen dem Futter beigemischt werden. Nur durch diese Form der Verabreichung ist bei der Intensivhaltung eine regelmäßige Verabfolgung und gleichmäßige Dosierung gewährleistet. Natürlich ist ein derartiger Einsatz eines Arzneimittels der unmittelbaren Kontrolle des Tierarztes entzogen, so daß in diesem Zusammenhang die Frage nach der ernährungshygienischen Unbedenklichkeit eines solchen Vorgehens zu stellen ist und beantwortet werden muß. Neben der als selbstverständlich vorauszusetzenden coccidiostatischen Wirksamkeit der zur Anwendung kommenden Verbindungen, die gleichzeitig eine natürliche Immunisierung nicht beeinträchtigen darf, muß einerseits die Toxizität der verwendeten Substanzen möglichst gering sein, damit auch bei eventuell vorkommenden Überdosierungen keine Schädigung der Tiere eintreten kann. Andererseits ist zu verlangen, daß das verwendete Coccidiostatikum nicht in den Geweben der behandelten Tiere angereichert wird, da hierdurch der Mensch, der solches Geflügelfleisch verzehrt, gefährdet werden kann.

Mir wurde daher die Aufgabe gestellt, die Toxizität der drei genannten Verbindungen zu überprüfen und vornehmlich nach der Verfütterung von Nicarbazin zu untersuchen, ob sich Rückstände dieser Substanz in Geflügelorganen auffinden lassen.

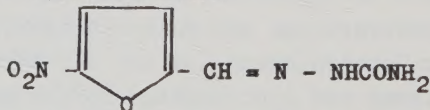
B. LITERATUR

1. Nitrofurazor

Auf der Suche nach bakteriostatischen und baktericiden Mitteln entdeckte DODD (10) 1944, daß Nitrogruppen am C₅-Atom des Furanringes die gewünschten Eigenschaften besitzen. Er fand, daß von 25 getesteten derartigen Verbindungen 24 in vitro bakteriostatisch wirksam waren und konnte den Beweis liefern, daß die Aktivität an die Nitrogruppe gebunden ist. Die Wirkung erstreckte sich auf Gram-positive und Gram-negative Keime.

Das Nitrofurazon (NFZ) zeichnete sich durch ein großes Spektrum und durch Bakterizidität in höheren Dosierungen aus (11). Es war auch gegen Anaerobier und Mycobacterium tuberculosis wirksam. SYNDER (12) wandte es bei der lokalen Wundbehandlung erfolgreich an.

Chemisch ist das Nitrofurazon ein 5-Nitro-2furaldehydsemicarbazon mit folgender Strukturformel:



Es ist ein gelbes, feines, in Wasser schwer (1 : 4200) lösliches Pulver, dessen Schmelzpunkt zwischen 227 und 241°C liegt. Seine maximale Absorption liegt in wässriger Lösung bei 3750 Å. In Gegenwart von Alkali färbt es sich intensiv rot. Es wurde auch ein wasserlösliches Nitrofurazon entwickelt und unter dem Firmennamen "Furacin" in den Handel gebracht (13).

Die coccidiostatische Wirksamkeit des Nitrofurazons wurde durch zahlreiche Untersuchungen, die hier nicht näher erörtert zu werden brauchen, unter Beweis gestellt (KEIDEL-BOS (1), VAN DOOREN (2), FRIESE (3), FRITZSCHE (4), TUGWELL (5) und MC LOUGHLIN (6)). Es stellte sich dabei heraus, daß eine Dosierung von 0,0067 % im Fertigfutter als optimal zu bezeichnen ist. Nach Versuchen von BERG (7), HARWOOD (8) und HORTON-SMITH (9) wird die Ausbildung der Resistenz durch den NFZ-Zusatz nicht beeinträchtigt.

Aus den Versuchen von TUGWELL (5) über fünf und denjenigen von BERG (16) über acht Wochen geht hervor, daß die Entwicklung der

Küken durch ein Futter, dem 6,7 mg % NFZ zugemischt wurden, auch ohne Eintreten einer Infektion nicht beeinflusst wird. NEWBERNE (14) konnte keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den Gruppen feststellen, die 0,0125 % bzw. 0,025 % NFZ mit dem Futter erhielten.

PETERSON (15) beobachtete Gewichtsdepressionen bei einer Konzentration von 0,020 % NFZ in der Ration. Einheitlich (16, 14, 15) stellten sich bei 0,04 bis 0,05 % NFZ im Futter Minderzunahmen und toxische Symptome ein.

Die Toxizität äußert sich nach HARWOOD (17) in Erregung. NEWBERNE (14) beschreibt bei einem Gehalt des Futters von 0,05 % NFZ Symptome der Polyneuritis und der Paralyse, ähnliche Erscheinungen, wie sie bei Mangel an B-Vitaminen auftreten. FRITZSCHE (18) beobachtete bei einer Konzentration von 0,07 % NFZ in der Futtermischung und erhöhtem B₂-Gehalt des Futters keine B-Mangelschäden, dagegen vermehrt kolikartige Symptome.

JUNGHERR (19) bestätigt Störungen des Nervensystems. KRANTZ (20) befaßte sich bei seinen Toxizitätsversuchen mit Mäusen und Ratten und fand Hyperirritabilität und Tremor als vornehmlich auftretende Merkmale. In seinen histologischen Studien konnte er bei oraler NFZ-Verabreichung nur gelegentlich Leberdegeneration feststellen. Bei sc. Applikation wies er Leberstrukturschäden und Kerndegeneration, Nierentubuliepithelschäden und geronnene Eiweißmassen in den Nierenkanälchen nach. Schäden, die mit den toxischen Symptomen in Einklang zu bringen wären, konnte er nicht aufzeigen. Die chronische LD₅₀ wird für Mäuse mit 38 mg/100 g Körpergewicht und für Ratten mit 59 mg/100 g Körpergewicht angegeben. An Hunden, Katzen und Affen angestellte Untersuchungen über Respiration, Blutdruck und Blutbild brachten keine Veränderungen. Auch mit Hilfe des EKG und des Elektroencephalogramms konnten keine Aufschlüsse gewonnen werden. Als Todesursache vermutet KRANTZ Kachexie und eventuell Versagen der Atmung.

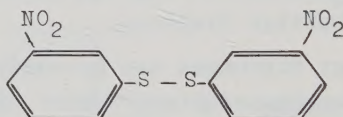
Blutbildstudien bei Geflügel von NEWBERNE (14) besagen, daß der HB-Gehalt bei Dosen von 0,05 % NFZ im Futter über 8 Wochen normal war und daß das Blutbild keine Veränderungen zeigte. Histologische Untersuchungen deckten unter den gleichen Bedingungen Nierentubuliepitheldegeneration, Ossifikationsknötchen in der Lunge und gelegentlich Leberdegeneration auf.

Durch Rückstandsbestimmungen, die in den U.S.A. und Deutschland durchgeführt wurden, konnte in keinem Fall, auch nicht bei erheblicher Überdosierung des NFZ, meßbare Gehalte in Leber, Muskulatur oder Fettgewebe nachgewiesen werden (21). Eventuell vorliegende Abbauprodukte des NFZ wurden bisher nicht gefunden. Jedenfalls sind uns über erfolgreich verlaufene derartige Versuche keine Literaturangaben bekannt geworden.

2. Nitrophenid

Nitrophenid (NP) wurde 1949 von der American Cyanamid Company neben Sulfamethazin als besonders wirksames Coccidiostaticum aufgefunden.

Chemisch handelt es sich um das m,m' -Dinitrodiphenyldisulfid mit der folgenden Strukturformel (22):



NP ist ein blaugraues, stabiles, in Wasser unlösliches Pulver. Es löst sich in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, wie z. B. Aceton. Von der Cyanamid Company wird es als 25 %ige Vor-mischung unter dem Namen "Megasul" in den Handel gebracht.

Auch für NP liegen zahlreiche Experimente vor, die für die coccidiostatische Wirksamkeit beweisend sind. (LUCAS (23), VALETZKY (24), SLEGER (25), WILLEMS (26))⁺. Als günstigste Dosierung wird ein Zusatz von 0,02 % zum Fertigfutter angegeben. Die natürliche Immunisierung wird durch diesen Zusatz nicht beeinträchtigt (23, 24).

Zur Toxizitätsbeurteilung von NP zieht LUCAS (23) die Durchschnittsgewichte nach 12-wöchiger Verabreichung heran. Diese waren bei einer Dosierung von 0,0125 % bis 0,04 % NP in der Futtermischung gleich den Kontrollen bzw. sogar etwas höher. Erhöhung der Konzentration auf 0,05 % führte zu Minderzunahmen. Mit der Dosierung von 0,025 % NP erzielte LUCAS die besten Gewichtszunahmen. Er empfiehlt diese Menge als optimale Dosis. VALETZKY

⁺ KANERGIS (27) und BRACKETT (28)

(24) konnte bei dauernder Verabreichung von 0,04 % NP mit dem Futter über 12 Wochen keinen Einfluß auf das Wachstum feststellen. Wurde dem Futter 0,05 % NP beigemischt, so stellte sich nach 14-tägiger Aufnahme als einziges Symptom eine geringere Gewichtszunahme ein. Steigerung auf 0,07 % führte nach 14 Tagen zu Stellungs- und Haltungsanomalien. Diese Erscheinungen konnten bei einer Konzentration von 0,1% NP in der Futterration schon nach 8 Tagen beobachtet werden. Eine Dosierung von 0,16 %NP war zwischen dem 12. und 18. Versuchstag letal.

Nach Angaben der Cyanamid Company (22) stellen sich bei Überdosierung von NP folgende Toxizitätssymptome ein: Abmagerung bis zu Kachexie, abnorme Kopf- und Körperhaltungen, Übererregbarkeit und ungeordnete Bewegungen. Weiterhin schwindet die Fähigkeit der Tiere, sich wieder aufzurichten, wenn sie auf den Rücken gelegt werden. Diese Erscheinungen werden als temporär angegeben; die Tiere normalisieren sich nach Abbrechen der Medikation innerhalb von 3 - 8 Tagen und wachsen gut weiter. LAYER (29) konnte bei Tieren, die 150 mg % NP von der 3. bis 15. Woche oder 100 mg % von der 4. bis 10. Woche erhalten hatten, pathologisch-anatomisch außer Abmagerung keine besonderen Veränderungen feststellen. Die histologische Untersuchung zeigte weder Leber- noch Nierenschäden. NEWBERNE (30) beobachtete dagegen bei Konzentrationen von 0,05 und 0,1 % NP im Futter nach 4 Wochen Muskel- und subcutane Hämorrhagien, Degenerationsherde um die Lebervenen, fokale Nekrosen und vakuoläre Entartung der Leber.

Durch Blutuntersuchungen stellte NEWBERNE (30) fest, daß bei einer Dosierung von 0,05 und 0,1 % NP im Futter am Ende der ersten Versuchswoche der HB-Gehalt etwas anstieg und ab der zweiten Versuchswoche abfiel. Ebenso nahm die Zahl der heterophilen Leukozyten etwas zu, während die Thrombozyten von der vierten Versuchswoche an leicht abnahmen.

Eine Beeinflussung von Legebeginn, Legeleistung, Schalenbildung, Befruchtung und Schlupffähigkeit (behandelte ♂ x behandelte ♀) konnte bei Tieren, die vom ersten Lebenstag bis zu einem Alter von 12 Wochen 0,04 % NP mit dem Futter erhalten hatten, nicht festgestellt werden (31).

In Hunderversuchen zeigte sich, daß NP-Gaben von 15 mg/kg Körpergewicht, täglich verabreicht, nach 17 Tagen Gewichtsabnahmen, Bewegungsstörungen und spastische Krämpfe hervorriefen. Diese Erscheinungen

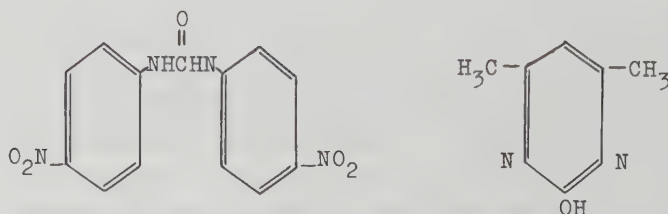
nungen verschwanden nach Abbrechen der Medikation. Andere Hunde erhielten Fleisch und Organe von Küken, denen neun Wochen lang 0,03 % NP mit der Futterration verabreicht worden war. Die Hunde zeigten keinerlei Toxizitätssymptome und waren in jeder Hinsicht normal, was auch durch die Sektion bestätigt werden konnte (31),

Bei einer unter Hinzuziehung von auserlesenen Feinschmeckern und Chemikern durchgeführten Geschmacksprobe wurde dasselbe Fleisch begutachtet, das den Hunden verfüttert wurde. Es wurde einheitlich geäußert, das Fleisch zeige keine Qualitätsminderung.

LICHTFIELD (32) entwickelte eine Bestimmungsmethode, mit der 0,5 mg NP pro 100 g Organprobe erfaßt werden können. Er konnte damit nur gelegentlich bei Tieren, die 5 Wochen lang Futter mit 0,1 % NP erhalten hatten, 3 - 6 Stunden nach der letzten Futteraufnahme 0,5 bis 1,7 mg % NP im Gewebe nachweisen. Diese Tiere hatten schon toxische Symptome gezeigt, so daß die Ansicht vertreten wird, Gewebegehalte von 0,5 mg % seien toxisch. In den weitaus meisten Fällen ist es aber bei Rückstandsbestimmungen nicht gelungen, NP nachzuweisen, was für rasche Ausscheidung oder schnellen Abbau spricht. Eine Kumulation scheint demnach nicht stattzufinden. Bisher konnten keine Literaturangaben aufgefunden werden, die Hinweise auf Abbauprodukte in den Organen oder den Exkreten enthalten.

3. Nicarbazin

CUCKLER (33) berichtete 1955, daß molekulare Komplexe von gewissen Carbaniliden antiparasitäre Eigenschaften besitzen. Die Merck-Sharp and Dohme Company, New York, entwickelte daraufhin das Nicarbazin (NC). Es ist ein äquimolekularer Komplex von 4-4'-Dinitrocarbanilid (DNC) und 2-Hydroxy-4,6-dimethylpyrimidin (HDP), hat ein Molekulargewicht von 426,4 und folgende Strukturformel (34):



Nicarbazin ist ein gelbes, geruchloses, nicht hygroskopisches, stabiles Pulver, das bei 257°C schmilzt. Der DNC-Anteil ist in organischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid oder Aethylacetat löslich, der HDP-Anteil ist wasserlöslich.

Die Carbanilide besitzen allgemein antiparasitäre Aktivität; Diese wächst aber auf das zehnfache an, wenn Carbanilide mit HDP in Verbindung treten. Diese Potenzsteigerung wird als Synergismus erklärt. Ein physikalisches Gemisch von DNC und HDP zeigt nur die beschränkte DNC-Wirksamkeit (39).

Über die Wirksamkeit von Nicarbazin gegen Coccidiose berichten CUCKLER (35, 36) und SIEGMANN (37). MC LOUGHLIN (6) stellt in vergleichenden Versuchen mit sechs verschiedenen Coccidiostatika NC in einer Dosierung von 0,0125 % im Futter als das wirksamste Mittel heraus. Diese Dosierung wird jetzt allgemein als günstigste empfohlen. Die natürliche Immunisierung wird durch diesen Zusatz nicht gestört.

Die Frage nach der Toxizität des NC wurde von verschiedenen Autoren aufgegriffen. In Toleranzversuchen von BARBER (38) und OTT (39) beeinflusste ein NC-Gehalt von 0,01 bis 0,04 % im Futter das Wachstum der Küken nicht. Aus einem Versuch von OTT (40) mit 34 400 Küken ergibt sich - statistisch hoch gesichert - daß mit 0,0125 % NC im Futter dieselben Durchschnittsgewichte und Futterverwertungszahlen erzielt werden wie ohne Nicarbazin. Aus einem Verträglichkeitsversuch (37) über 60 Tage geht deutlich hervor, daß bis zu einer Konzentration von 0,02 % NC im Futter die Entwicklung der Küken in keiner Hinsicht beeinflusst wurde und erst bei 0,06 % NC Wachstumsdepressionen auftraten. MUSHETT (41) verzeichnet bei 0,04 % NC im Futter um 10 % geringere Gewichte. Die maximal vertragene Einzeldosis von Nicarbazin bei Hühnern gibt CUCKLER (36) mit 800 mg pro kg Körpergewicht an; LD_{50} für Hühner liegt bei 2,4 g/kg.

Einen Beweis für die Unschädlichkeit von NC sieht MUSHETT (41) darin, daß die Blutgerinnungszeit, der HB-Gehalt, die Prothrombinzeit, die Leukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung bei Versuchen über 13 Wochen auch bei einer Konzentration von 0,16 % NC im Futter nicht verändert waren. Nach NEWBERNE (42) ist zwar bei gleichem NC-Angebot nach sechs Wochen eine Tendenz zur Abnahme der Heterophilen und in ähnlicher Weise der Thrombozyten zu beobachten. Im weiteren Versuchsverlauf tritt dann aber Normalisierung ein.

Die Ergebnisse der genauen pathologisch-anatomischen und histologischen Untersuchungen MUSHETTs (41) stimmen mit denen von RUBIN (43) überein. Es waren bei 0,10 % NC in der Futterration über 13 Wochen keine pathologisch-anatomischen Veränderungen festzustellen. Erst bei 0,16 % NC im Futter fand MUSHETT fette Leberdegeneration, Hypertrophie der Kupfer'schen Sternzellen, Hämosiderinablage, generalisierte Hodenhypotrophie, Hemmung der Spermatogenese und in zwei Fällen Ossifikationspunkte in der Lunge. Nierenepitheldegeneration konnte er im Gegensatz zu NLWBERNE (42) nicht finden. MUSHETT gibt noch an, daß die Relativgewichte von Leber, Herz und Pankreas mit steigendem NC-Gehalt im Futter ebenfalls anstiegen, während die Hodengewichte abnahmen.

Aus länger dauernden Versuchen über die Geschlechtreifeperiode hinweg geht hervor (39), daß der Legebeginn und die Samenproduktion durch Normaldosen nicht beeinflußt werden. Es traten aber verschiedene temporäre Effekte auf. Die Schalenfarbe von normalerweise pigmentierten Eiern blaßt nach drei bis vier Tagen NC-Verabreichung ab, wird schließlich ganz weiß und normalisiert sich fünf bis 10 Tage nach Abbrechen der NC-Gabe wieder (44). Dieser Effekt wird bereits durch einen Gehalt von 0,003 % NC im Futter hervorgerufen. SCHWARZ (45) berichtet dazu, daß der Ooporphyringehalt (Protoporphyrin) der Schalen um ca. 40 % geringer ist, die Ooporphyrinbildung aus dem Blutfarbstoff aber nicht derartig beeinflußt wird, daß das Ooporphyrin vollständig aus der Schale verschwinden würde. Die Fluoreszenz- und Durchleuchtungsintensität der Eier wird durch Nicarbazin nicht einheitlich beeinflußt.

An Legehennen kann Nicarbazin nicht gegeben werden, weil dieser Schaleneffekt nicht die einzige nachteilige Wirkung ist. So beeinflußt nach BAKER (46), POLIN (47), SHERWOOD (48) und WEISS (49) eine Dosis von 0,006 % NC im Mischfutter bereits das Eigewicht nachteilig; die Legeleistung sinkt bei einer Gabe von 0,009 bis 0,0125 % NC (nach MC LOUGHLIN 50) bis um 50 %).

Ein weiterer Effekt wurde von POLIN (47) festgestellt und von VAN TIENHOVEN (51) bestätigt. Durch Verfütterung von 0,005 % NC treten Dottertrübungen und Dotterflecken auf. POLIN stellte fest, daß die Durchschnittsdottergewichte gelagerter Eier höher waren als die frischer, und auch die Trübungen waren bei 8 Tage alten Eieren stärker, bei den Eiweißgewichten war es umgekehrt. POLIN gibt

für folgende Erklärung: Im Dotter wurde DNC nachgewiesen; er nimmt daher an, daß dieser DNC-Gehalt die Permeabilität der Dottermembran beeinflusst, was zu einem Übertritt von Wasser aus dem Eiweiß in den Dotter führt. Die Eiweißqualität wird nicht vermindert. Die Stärke der Dotterveränderung geht mit der Konzentration des NC im Futter parallel.

Übereinstimmend (34, 36, 48, 52) wird angegeben, daß die Schlupffähigkeit durch Verabreichung eines Futters mit einem Gehalt von 0,005% NC schon bei 60 % der Eier und durch ein Futter mit 0,02 % NC bei 90 % der Eier abnimmt, obwohl die Fruchtbarkeit als solche (52) nicht herabgesetzt ist. Aus POLINs Rückstandsbestimmungen im Dotter (53) geht hervor, daß durch 2g DNC/g Dotter dieser Effekt erreicht wird.

Alle diese in den letzten vier Abschnitten genannten Effekte werden als temporär angegeben und verschwinden spätestens 10 Tage nach Verabreichung von NC-freiem Futter.

PORTER (54) stellte nach Erarbeitung der colorimetrischen Bestimmungsmethode in Resorptions- und Exkretionsversuchen fest, daß Nicarbazin vom Darm nicht ganz als solches resorbiert wird. Ein Teil NC wird in DNC und HDP zerlegt und mehr oder weniger unabhängig voneinander resorbiert. Aus der Komplexverbindung Nicarbazin wird der DNC-Anteil schneller resorbiert als der HDP-Anteil, während aus einem physikalischen Gemisch HDP leichter resorbiert wird. HDP wird sehr schnell und größtenteils unverändert ausgeschieden. Es ist wenig toxisch. Seine akute LD₅₀ bei Mäusen wird von KUNA (59) mit 4 g/kg Körpergewicht angegeben. Bei Rückstandsbestimmungen konnte PORTER im Blut kein HDP nachweisen, wohl dagegen in der Leber. Allerdings war die Leber nach 24 Stunden Normalfutter HDP-frei.

Die Ausscheidung des DNC-Anteils erfolgt langsamer. Ein theoretisch mögliches Umwandlungsprodukt des DNC ist das p-Nitranilin. Es ist sehr toxisch und ein starker Methämoglobinbildner. Allerdings konnte Methämoglobin nie im Blut nachgewiesen werden (54). Ein Anwachsen diazotierbarer Substanzen wurde im Blut ebenfalls nicht festgestellt. Unter welchen Bedingungen diese Ergebnisse gewonnen wurden (Höhe der NC-Gabe und Untersuchungszeit) wird von den Verfassern nicht angegeben (54).

Versuche von CLARK (55) mit C₁₄-markiertem Nicarbazin bestätigen die colorimetrisch ermittelten DNC-Gehalte im Gewebe. Dadurch konnte

auch gezeigt werden, daß DNC nicht gespeichert und in zwei bis vier Tagen nach dem Absetzen der Nicarbazinfütterung vollkommen ausgeschieden wird.

Nach diesen Ergebnissen scheint das Nicarbazin im Körper nicht dem Abbau zu unterliegen, sondern - gespalten in DNC und HDP - unverändert ausgeschieden zu werden.

OTT (39) fütterte Hunde 114 Tage mit dem Fleisch und den Organen von Küken, die NC (0,0125 % des Futters) erhalten hatten. Die Hunde wuchsen gut weiter und zeigten keine Abnormitäten in Erscheinung und Benehmen. Auch Blutproben von diesen Hunden entsprachen dem Blutbild normaler Hunde; die Sektion war ohne Befund.

Ein Versuch von GYLSTORFF (56) ist noch zu erwähnen. Die Verfasserin beobachtete bei Zugabe von Nitrofurazon, Nitrophenid und Nicarbazin in gebräuchlichen Dosierungen in den ersten 14 Tagen Wachstumsverzögerungen, die sich später wieder ausglich.

GYLSTORFF fordert daher für das Starterfutter erhöhten Vitamin-A-Gehalt ohne Coccidiostatica, da sie zu der Auffassung neigt, der höhere Vitamin-A-Gehalt des Futters über mindestens dieselbe Wirkung auf den Verlauf der Coccidiose und die Resistenzausbildung aus wie die Coccidiostatica, eine Annahme, die - jedenfalls hinsichtlich des Nitrophenids - durch Untersuchungen von SCHOOOP (57) widerlegt sein dürfte. SCHOOOP verglich die coccidiostatische Wirkung einer Konzentration von 0,025 %NP im Futter mit einem Zusatz an Vitamin A (10 000 E pro kg Futter). Nach dem erhaltenen Ergebnis ist das Vitamin A in der gewählten Dosierung nur halb so wirksam wie das Nitrophenid.

In dieser kurzen Literaturübersicht wurde angedeutet, daß die coccidiostatische Wirksamkeit der drei hier zur Diskussion stehenden Verbindungen durch eine große Anzahl von Untersuchungen belegt worden ist. Weniger zahlreich sind dagegen Versuche über die ernährungshygienische Unbedenklichkeit des Einsatzes derartiger Substanzen. Um über die Unschädlichkeit dieser Coccidiostatica für das Geflügel mehr zu erfahren, haben wir in eigenen Versuchen den Einfluß dieser drei Verbindungen in verschiedenen Dosierungen auf das Wachstum und die Futterverwertung überprüft. Durch analytische Untersuchungen wurde weiterhin ermittelt, ob und wieviel Coccidiostatica als Rückstände in Muskulatur und Organen gefunden werden. Das Schwergewicht der eigenen Untersuchungen wurde auf die Rückstandsbestimmung des in dieser Hinsicht besonders interessanten Nicarbazin gelegt.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Tierversuche

Die Tierversuche wurden 1. mit Eintagsküken und 2. mit Jungtieren im Alter von 10 Wochen durchgeführt (Übersichtstabellen über die Anlage der beiden Versuche befinden sich auf S. 12 bzw. 24).

1. a) Anlage des Kükenversuches

Für diesen Versuch standen 230 sortierte Eintagsküken der Rasse Nichols 108 zur Verfügung. Bis zum 5. Lebenstag erhielten alle Küken ein Aufzuchtfutter entsprechend der Norm des Vereins deutscher Wirtschaftsgeflügelzüchter, um dadurch bis Versuchsbeginn schon eine gewisse Vorauslese zu treffen. Am Versuchsbeginn (5. Lebenstag) wurden sämtliche Tiere einzeln gewogen, in Gewichtsklassen mit 1 g Unterschied eingeteilt und aus der jeweiligen Gewichtsklasse zufällig den einzelnen Gruppen zugeordnet. Die leichtesten und schwersten Tiere des Schlupfes wurden bei der Wägung zur Verringerung der Streuung der Ergebnisse ausgeschieden. Die Zuteilung der einzelnen Rationen zu den Gruppen erfolgte durch Anwendung einer Zufallsreihe. Hierdurch sollten systematische Fehler ausgeschaltet werden. Die Anwendung einer Zufallsreihe scheint einem System (zum Beispiel lateinischen Rechteck oder Gitter) überlegen. Die folgende Tabelle gibt die einzelnen Gruppen und die Anzahl der Tiere je Gruppe an.

Tabelle I

Geschlecht	K1 *	K2 *	K3 *	1			2			3		
				a	b	c	a	b	c	a	b	c
				NC *	NC	NC	NFZ *	NFZ	NFZ	NP *	NP	NP
				12,5	25,0	62,5	6,7	33,5	67,0	20,0	40,0	100,0
				mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %
Zahl der ♂	5	5	5	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Zahl der ♀	5	5	5	10	10	10	10	10	10	10	10	10

* Anmerkung:

K 1, 2, 3	=	Kontrollgruppe 1, 2, 3;
NC	=	Nicarbazin; Versuchs-Gruppe 1
NFZ	=	Nitrofurazon; Versuchs-Gruppe 2
NP	=	Nitrophenid; Versuchs-Gruppe 3

Während der Versuchszeit über 8 Wochen waren die Küken in Aufzuchtbatterien aus Metall auf Maschendrahtgitter untergebracht. Die Feststellung der Zunahmen der einzelnen Versuchsgruppen erfolgte durch wöchentliche Einzelwägung der Tiere, wobei das Durchschnittsgewicht pro Küken je Gruppe errechnet wurde. Ebenso wurde der Futterverbrauch pro Gruppe festgestellt, weil Einzelfütterung nicht möglich war. Futter und Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Die während der Versuchszeit verabreichte Ration wurde im "Lödige"-Futtermischer des Institutes gemischt und setzte sich folgendermaßen zusammen:

	%
Mais	25,0
Weizen	20,0
Gerste	20,0
Weizennachmehl	12,1
Sojaschrot	10,0
Dorschmehl	10,0
Dicalciumphosphat	1,0
Calciumcarbonat	0,7
Kochsalz (NaCl)	0,2
Vitamin-Vormischung	<u>1,0</u>
	100,0

Die Vormischung enthielt soviel der unten angeführten Stoffe, daß in 1 kg Fertigfutter folgende Mengen enthalten waren:

Vitamin A	5000 I. E.
Vitamin D ₃	1000 I. E.
Vitamin B ₂	2 mg
Pantothensäure	5 mg
Nicotinsäure	10 mg

Außerdem enthielt die fertige Futtermischung die in Tabelle I (S. 12) aufgeführten Konzentrationen der einzelnen Coccidiostatica, die analytisch überprüft wurden. Die Abweichungen betragen maximal $\pm 5\%$, entsprechend der Fehlerbreite des Bestimmungsverfahrens. Es errechnet sich folgende Grundzusammensetzung der Futtermischung:

Protein	19,80 %
Rohfaser	3,90 %
Calcium (Ca)	1,11 %
Phosphor (P)	0,79 %
produktive Energie nach FRAPS	1934,0;
Protein: Energie	= 1:98

b) Ergebnisse und Diskussion

Die Gewichtsentwicklung der einzelnen Gruppen ist aus den graphischen Darstellungen (Abb. 1 mit 3) ersichtlich. Die Durchschnittsgewichte vom 56. Lebenstag, die Futterverwertung, die Standardabweichung nach der Formel

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}} \quad \text{xx}$$

und der Variationskoeffizient, der nach der Formel $s \% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$ errechnet wurde, sind aus Tabelle II er-

sichtlich.

xx) Anmerkung Seite 15

Tabelle II

Versuchs- gruppe	Durchschn.- gewicht am 56. Lebenstg.		Futter- ver- wertung		♂				♀			
	♂ + ♀	n	$\bar{x}$	+ s	s %	n	$\bar{x}$	+ s	s %	n	$\bar{x}$	+ s
K 1+2+3	1100	15	1120	32,3	2,89	15	1080	33,7	3,12			
NFZ 6,7 mg %	960	10	995	40,0	4,05	10	925	20,7	2,26			
NFZ 33,5 mg %	660	9	690	44,9	6,38	9	636	25,3	3,96			
NP 20,0 mg %	960	9	990	30,9	3,13	10	925	38,6	4,18			
NP 40,0 mg %	920	10	920	40,4	4,40	9	914	49,6	5,43			
NP 100,0 mg %	515	8	520	46,6	8,97	8	506	40,6	8,02			
NC 12,5 mg %	1045 *	6	1060 *	49,8	5,00	6	1030 *	24,2	2,34			
NC 25,0 mg %	1115 *	6	1199 *	44,1	3,67	6	1029 *	21,3	2,06			
NC 62,5 mg %	765 *	6	805 *	32,4	4,07	6	726 *	23,0	3,16			

* siehe Text

++ Anmerkung: s = Standardabweichung; (n-1) = Zahl der Freiheitsgrade;
 $\sum$ = Summenzeichen; $\bar{x}$ = Durchschnittsgewicht;
x = Einzelgewicht; s % = Variationskoeffizient;
n = Anzahl der Tiere;

Abb. 1

GEWICHTSVERLAUF der TIERE
mit NITROFURAZON

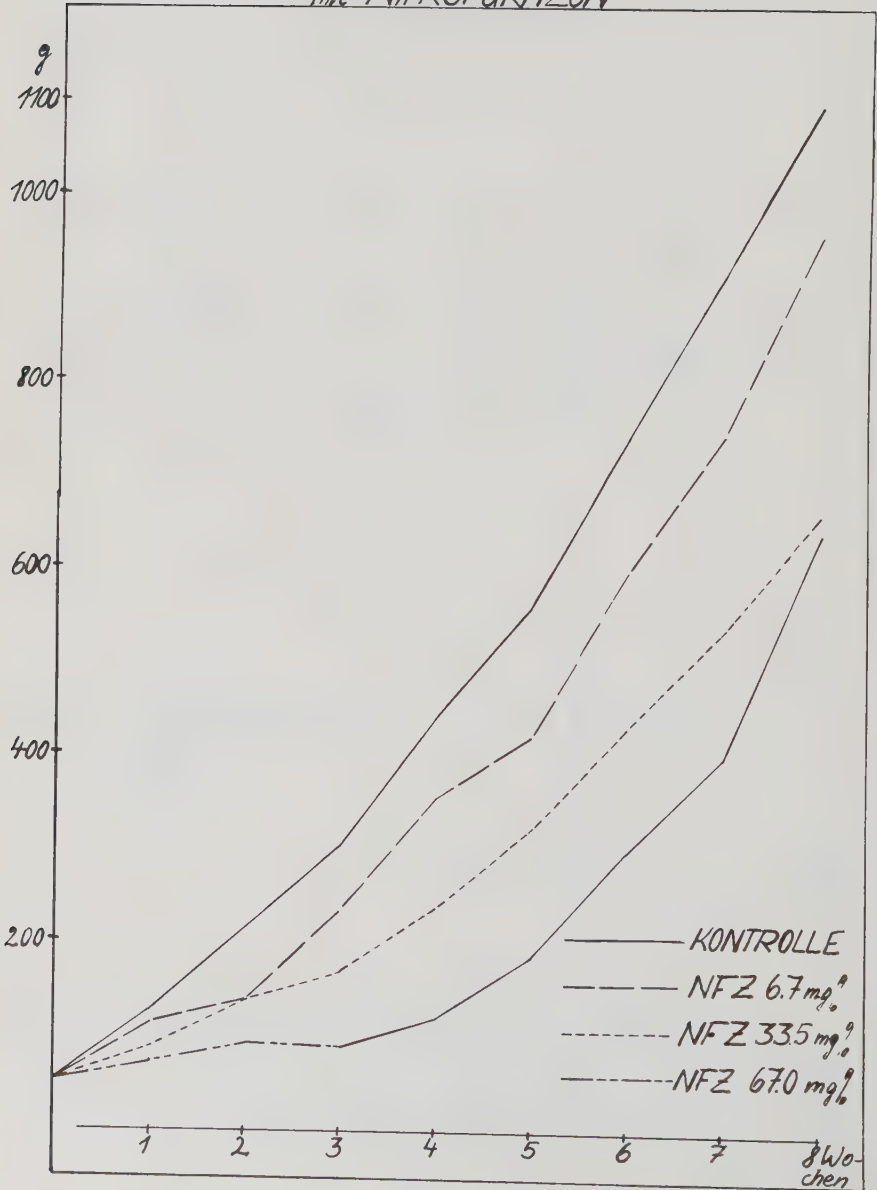


Abb. 2

GEWICHTSVERLAUF der TIERE mit NITROPHENID

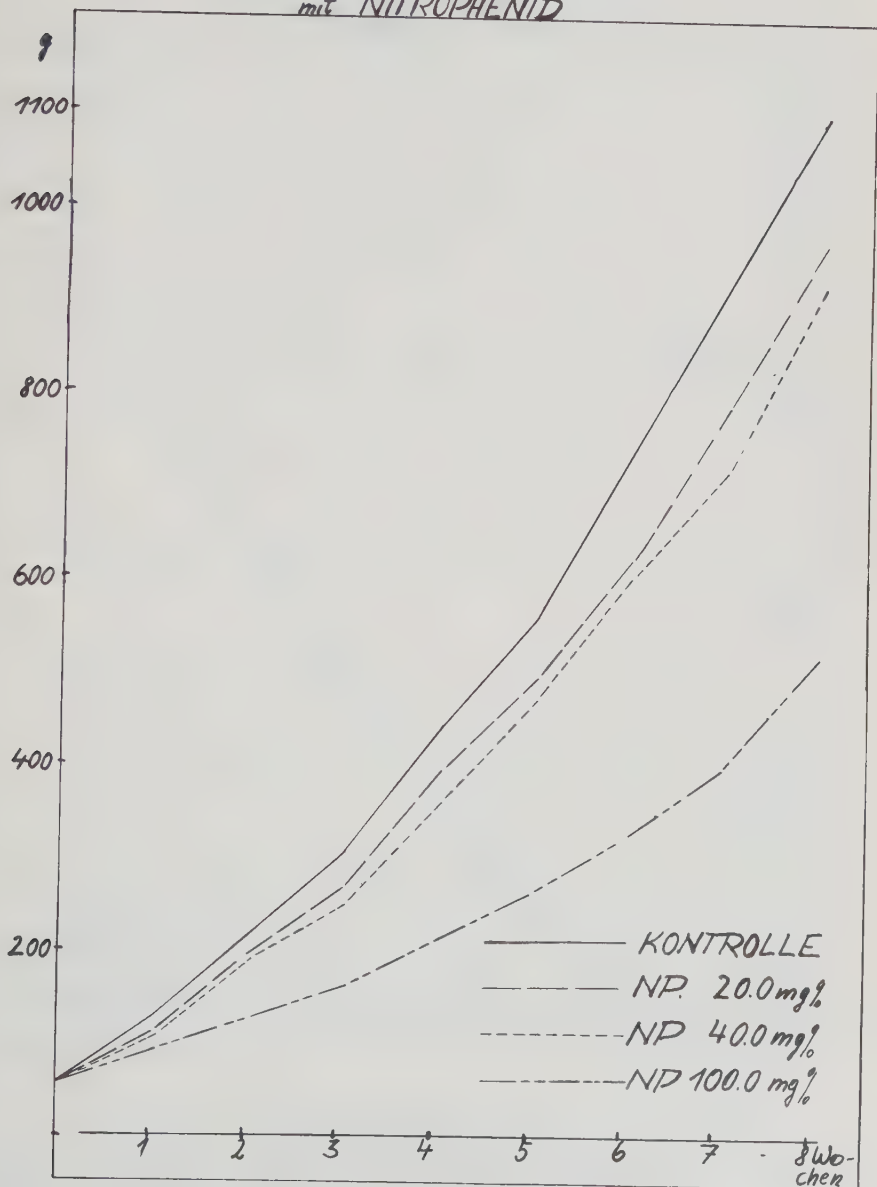
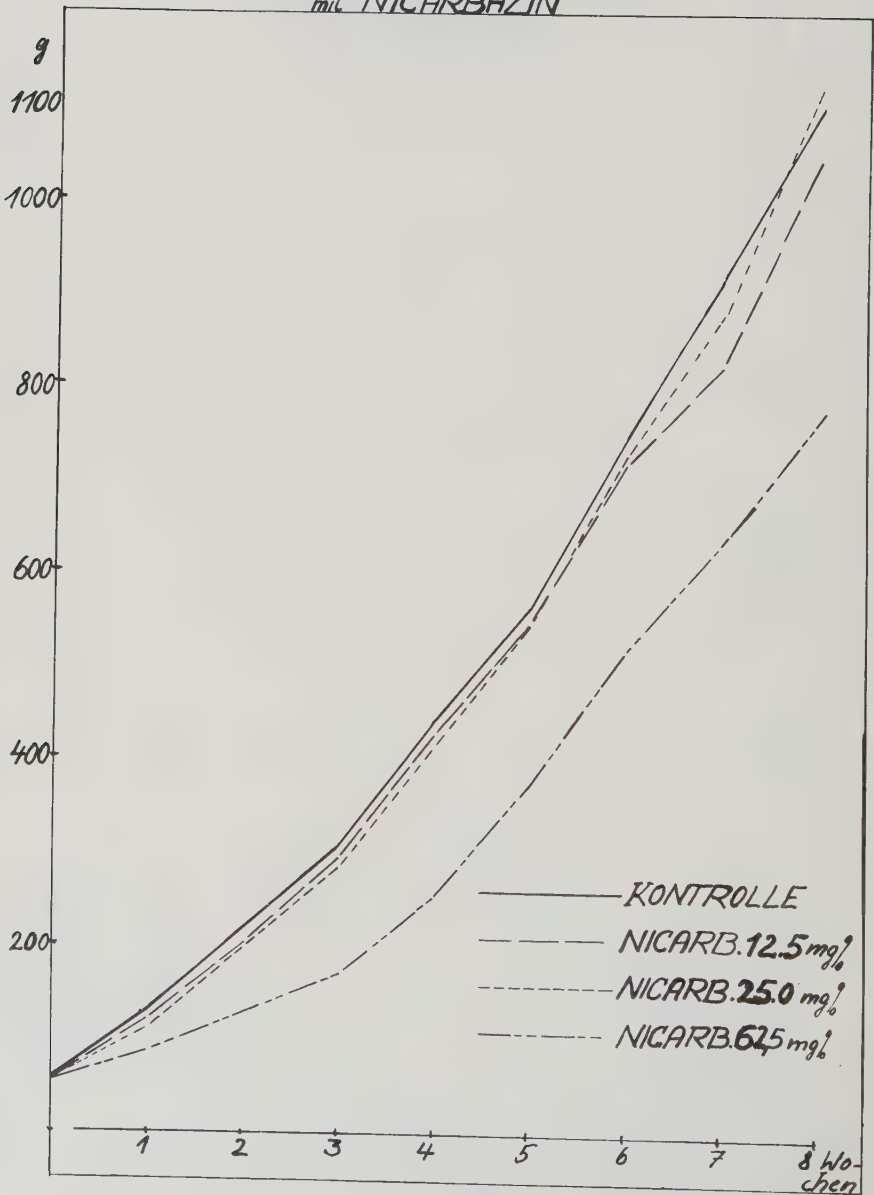


Abb. 3

GEWICHTSVERLAUF der TIERE
mit NICARBAZIN



Die Aussagefähigkeit des Versuches über die Verträglichkeit der Präparate, geschlossen aus der Gewichtsentwicklung, wird dadurch eingeschränkt, daß die Tierzahl klein und eine Wiederholung der einzelnen Versuche nicht möglich war. Außerdem wurden aus den Nicarbazingruppen in 14-tägigem Abstand Tiere mittleren Gewichtes herausgenommen, getötet und Rückstandsbestimmungen zugeführt, denen der eigentliche Versuch galt. Aus Vorversuchen war nämlich bekannt, daß nur bei Nicarbazin Rückstände in den Geflügelorganen gefunden werden. Die Schlachtungen wurden in 14-tägigem Abstand durchgeführt, um festzustellen, ob sich die Rückstandsgelhalte ändern oder eine Kumulation auftritt.

Die Futterverwertung konnte nicht mit hinreichender Genauigkeit ermittelt und damit nicht als Maßstab herangezogen werden, weil der Verstreu nicht einzeln gesammelt werden konnte und in den verschiedenen Gruppen sehr unterschiedlich war. Besonders stark war der Verstreu beispielsweise in den Gruppen 3 b und 3 c, deren Futter mit 40 bzw. 100 mg % NP angereichert war, weil in diesen Batterien mehrere Tiere krumme Schnäbel bekamen und der Futterneid sich mehr entwickelte. Bei den Kontrollen war der Verstreu sehr gering; diese Batterien waren nur mit halb soviel Tieren besetzt.

Aus dem Verlauf der Wachstumskurven ist zu erkennen - besonders bei den Gruppen 1 c und 2 b, die 62,5 mg % NC bzw. 33,5 mg % NFZ mit dem Futter erhielten -, daß nach einer Adaptionsperiode von drei Wochen die durchschnittlichen wöchentlichen Zunahmen besser waren als zu Versuchsbeginn. Setzt man den absoluten Zuwachs der Kontrollen in den ersten drei Wochen gleich 100,0, so betrug dieser für dieselbe Periode bei der NFZ-Dosis von 33,5 mg % 44,0 und bei der NC-Dosierung von 57,5 mg % 46,0; während der restlichen Versuchszeit von der 3. bis 9. Woche war dieses Verhältnis 100 : 62,3 beziehungsweise 100 : 74,8.

Auch bei den übrigen Gruppen ist diese Tendenz vorhanden, kommt aber nicht so deutlich zum Vorschein. Ähnliche Befunde gibt GYLSTORFF (56) an.

Aus der berechneten Standardabweichung läßt sich erkennen, daß mit steigender Dosierung, das heißt geringerem Wachstum, die Streuung der Ergebnisse zunimmt, was besonders deutlich aus dem Variationskoeffizienten (s %) hervorgeht..

Als Normdosierungen sind pro 100 g Futter von NFZ 6,7 mg, von NP 20,0 mg und von NC 12,5 mg anzusehen. Die durchschnittlichen Endgewichte der Tiere zeigen bei Anwendung dieser Normdosierungen mehr oder weniger deutliche Unterschiede gegenüber den Kontrollen. Aus oben genannten Gründen kann aber nicht der Schluß gezogen werden, daß die Normdosierungen Gewichtsdepressionen zur Folge hätten.

Im einzelnen wurden während der Verfütterung der verschiedenen Coccidiostatica folgende Beobachtungen registriert:

α) Nitrofurazon

In der Gruppe 2c, die NFZ in einer Dosierung von 67,0 mg % mit dem Futter erhielt, waren schon am 5. Versuchstag die ersten klinischen Erscheinungen bemerkbar. Die Tiere machten einen kranken Eindruck, piepsten laut und drängten sich in einer Ecke zusammen. Mattigkeit, Schläfrigkeit, gesträubtes Federkleid und schlechte Gewichtszunahmen waren die hervortretenden Symptome (Abb. 9). Die Futteraufnahme war sehr gering, der Wasserbedarf etwas erhöht. Kot wurde in sehr kleinen Mengen ausgeschieden, der Harn schien vermehrt. Beide Exkremente waren sehr stark gelb verfärbt. Am 9. Versuchstag starben aus dieser Gruppe die ersten drei Tiere und zwischen 9. und 21. Versuchstag waren 17 von 20 Tieren verendet. Besondere Toxizitätssymptome traten nicht auf. Den restlichen drei Tieren wurde ab 21. Versuchstag bis Versuchsende Kontrollfutter ohne das Coccidiostaticum verabreicht. Das weitere Wachstum dieser drei Tiere ist aus der Wachstumskurve ersichtlich (ab 4. Woche durchgezogen dargestellt). Die Küken erholten sich allmählich und die wöchentlichen Gewichtszunahmen wurden ständig besser. Aus dem Verlauf der Wachstumskurve (Abb. 1) ist zu entnehmen, daß auch die Dosierung von 33.5 mg % NFZ, über längere Zeit verabreicht, Gewichtsdepressionen zu Folge hat. Die geringen Gewichtszunahmen der Gruppe 2a (6.7 mg % NFZ) mögen teilweise durch die sehr ungünstigen Lichtverhältnisse dieser Gruppe verursacht worden sein. Diese Gruppe war in einer Batterie untergebracht, die auf dem Boden stand während die übrigen Gruppen darüber angeordnet waren. Bei anderen im Institut durchgeführten Wachstumsversuchen wird allgemein 0,0067 % NFZ den Rationen beigemischt. Die durchschnittlichen Achtwochengewichte der Küken bei diesen Versuchen liegen zwischen 1050 und 1200 ähnlich den Kontrollgruppen dieses Coccidiostaticum-Versuches.

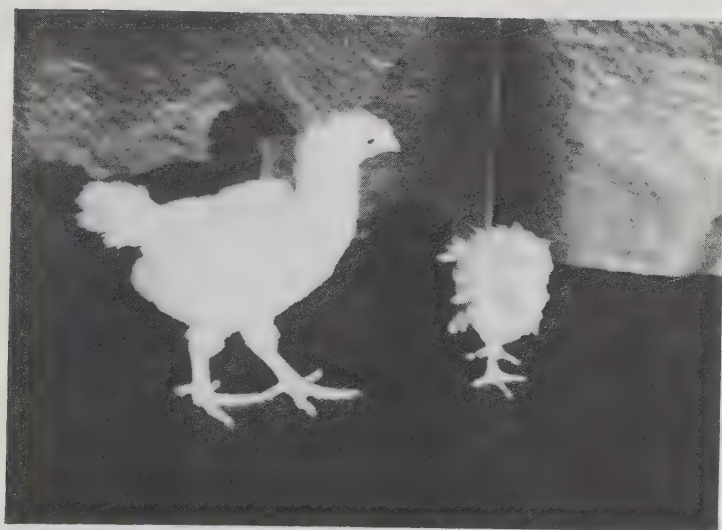


Abb. 7 und 8: Vergleich eines Kontrolltieres mit Tieren der Gruppe 2c (67,0 mg % Nitrofurazon) am 20. Versuchstag

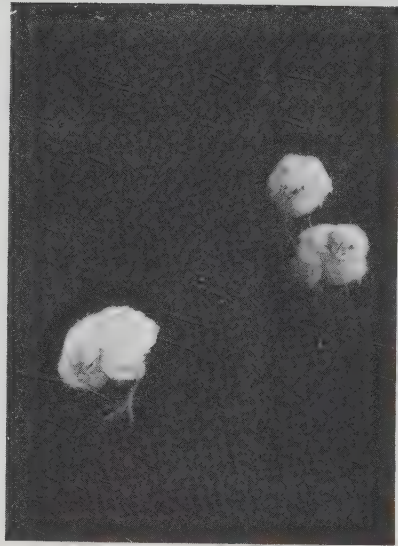


Abb. 9 Tiere der Gruppe 2c (67,0 mg % Nitro-
furazon) am 10. Versuchstag

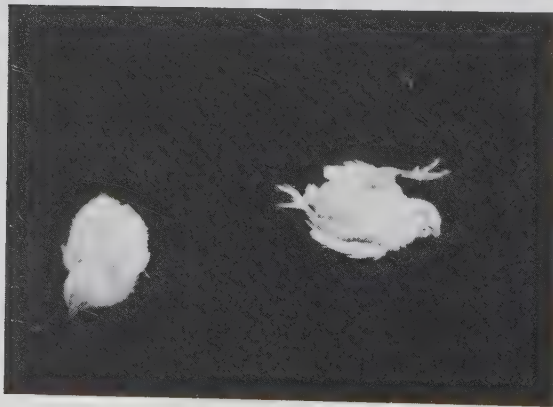


Abb. 10 Tiere der Gruppe 3c (100 mg % Nitro-
phenid) am 10. Versuchstag

β) Nitrophenia

In der Gruppe 3 c (100 mg % NP) stellte sich schon am 4. Versuchstag bei drei Küken Mattigkeit ein. Sie lagen auf einer Körperseite am Boden und konnten sich nur unter großen Anstrengungen wieder aufrichten. (Abb. 10) Gestäubtes Gefieder und hängende Flügel waren schon bei mehreren Tieren bemerkbar. Später zeigten sie abnorme Haltung des Kopfes in der dorsalventral-Achse, und zwar so stark, daß die Schnabelspitze die ventrale Halsseite berührte. Oft berührte der Schnabel den Boden. Schläfrigkeit überfiel die Tiere häufig am Futtertrog.

Nach 10 Versuchstagen waren obige Erscheinungen bei fast allen Tieren dieser Gruppe deutlich. Noch stärker traten Symptome der Incoordination hervor. Obwohl im Raum völlige Ruhe herrschte, flatterten plötzlich Tiere in der Luft oder liefen rückwärts durch die Batterie und fielen dann um. Wollte man sie fangen, so zeigten sie momentan gesteigerte Fluchtreaktion und ließen sich erst nach einiger Zeit anfassen. Kopfhaltungen, dem Bild der Encephalomalazie entsprechend, waren deutlich. Auf den Rücken gelegte Tiere konnten sich nur in den seltensten Fällen aufrichten. Verluste traten jedoch bei dieser Dosierung über acht Wochen nicht auf.

Am 14. Versuchstag wurden drei Tiere, die obige Erscheinungen deutlich zeigten, aus dem Versuch genommen und ihnen Kontrollfutter verabreicht. Nach 5 Tagen hatten sich zwei Tiere und am sechsten Tag auch das dritte normalisiert. Sämtliche Symptome waren verschwunden. Nach acht Tagen Kontrollfutter wurden diese Tiere wieder in die entsprechende NP-Gruppe (100,0 mg %) zurückgebracht; fünf Tage später stellten sich die früheren Symptome wieder ein.

Bei einem zusätzlich angesetzten Versuch mit 200,0 mg % und 100,0 mg % NP in der Futterration zeigte die erste, höher dosierte Gruppe ab 3. Versuchstag Haltungs- und Stellungsanomalien, und sämtliche Tiere starben zwischen dem 5. und 9. Versuchstag nach 24 bis 48-stündiger praemortaler Agonie. Bei den Tieren, die 100,0 mg % NP erhalten hatten, wurden fast dieselben Zunahmen erzielt wie beim ersten Versuch; auch bei diesem Zusatzversuch verendete kein Tier.

Bei der Gruppe 3 b (40,0 mg % NP) waren über die Versuchszeit geringere Gewichtszunahmen zu verzeichnen; daraus kann man nicht den Schluß ziehen, daß diese Dosierung bereits toxisch ist.

8) Nicarbazin

Bei den NC-Versuchen traten bei den gewählten Futterkonzentrationen von 12,5, 25,0 und 62,5 mg % keine ausgesprochen toxischen Erscheinungen und überhaupt keine Verluste auf. Bei der Gruppe 1c mit der höchsten Dosierung (62,5 mg %) war lediglich eine Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit, bei gleichzeitig gesträubtem Gefieder zu beobachten.

Das Endgewicht der Gruppe mit der doppelten NC-Dosierung (25,0 mg %) liegt etwas über dem der Kontrollen, was auch dafür spricht, daß die bei der Normaldosierung gefundenen Minderzunahmen nicht als Toxizitätsfolge aufgefaßt werden dürfen.

2. a) Anlage des Junggeflügelversuches

Für diesen Versuch wurden 140 Tiere im Alter von 9 - 12 Wochen mit einem Gewicht zwischen 900 und 1300 g ausgewählt und auf 14 Gruppen verteilt. Jede Gruppe wurde in einer Metallbatterie untergebracht. Das Durchschnittsgewicht der einzelnen Gruppen schwankte am Anfang des Versuches zwischen 1085 und 1115 g. Es wurden New Hampshire und Kreuzungstiere Leghorn x New Hampshire- und Nichols 108 verwendet. Zwei Gruppen dienten als Kontrollen, den übrigen Batterien wurde unter Anwendung einer Zufallsreihe ein Coccidiostaticum zugeordnet. Die verwendeten Coccidiostatica und Dosierungen gehen aus der Tabelle III hervor.

Tabelle III

Gruppen		Dosierungen		
	a	b	c	d
K1	K2			
1 NFZ	6,7 mg %	33,5 mg %	67,0 mg %	134,0 mg %
2 NP	20,0 mg %	40,0 mg %	100,0 mg %	200,0 mg %
3 NC	12,5 mg %	25,0 mg %	62,5 mg %	125,0 mg %

Diese Coccidiostatica-Dosierungen wurden in folgende Ration eingemischt:

	%
Mais	20,0
Weizen	20,0
Gerste	17,5
Weizennachmehl	16,5
Sojaschrot	15,5
Dorschmehl	7,0
Dicalciumphosphat	1,0
Calciumcarbonat	1,0
Na-Chlorid	0,5
Vitamin-Vormischung	<u>1,0</u>
	100,0

Die Vormischung enthielt soviel der unten angeführten Stoffe, daß in 1 kg Fertigfutter folgende Mengen enthalten waren:

Vitamin A	5000 I.E.
Vitamin D ₃	1000 I.E.
Vitamin B ₁₂	10 μ
Vitamin B ₂	3 mg
Nicotinsäure	30 mg
Pantothensäure	10 mg

+ Coccidiostatica in den angegebenen Dosierungen.

Die errechneten Gehalte der Ration sind folgende:

Protein	20,6 %
Rohfaser	4,6 %
Calcium (Ca)	1,16%
Phosphor (P)	0,83%

prod. Energie nach FRAPS 1872; Protein : Energie = 1 : 90,8

Futter und Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Der Versuch lief über sechs Wochen. Einzelwägungen wurden wöchentlich durchgeführt. Die Futterverwertung wurde nicht festgestellt, weil sich herausstellte, daß diese großen Tiere aus den Futtertrögen sehr große Mengen herausschleuderten und so keine annähernde Genauigkeit erzielt werden würde.

b) Ergebnisse und Diskussion

Die effektiven Gehalte der drei Coccidiostatica lagen in dem Schwankungsbereich der Bestimmungsverfahren ($\pm 5\%$), das heißt, sie entsprachen den gewünschten Dosierungen. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV und Abbildung 4 mit 6 zusammengefaßt.

Tabelle IV

Gruppe	durchschn. Zuwachs bzw. Abnahme in g	$\pm s$	s %
K	+ 475	58,4	12,3
NFZ 6,7 mg %	+ 470	58,6	12,5
NFZ 33,5 mg %	+ 376	59,6	15,8
NFZ 67,0 mg %	- 154	59,4	7,7
NP 20,0 mg %	+ 513	64,1	12,0
NP 40,0 mg %	+ 422	74,2	17,5
xx) NP 100, 0 mg %	- 81	-	-
NC 12,5 mg %	+ 470	31,0	6,6
NC 25,0 mg %	+ 355	54,1	16,4
NC 62,5 mg %	+ 267	45,2	16,9
NC 125,0 mg %	- 262	-	-

xx) Anmerkung: Zusatzversuch siehe Text!

Aus der Tabelle IV und den Abbildungen (4 mit 6) geht hervor, daß die Zunahmen bei den Normaldosierungen der drei Coccidiostatica denen der Kontrolle entsprechen bzw. sogar etwas höher liegen.

♠) Nitrofurazon

Die Zunahmen bei Verwendung der fünffachen NFZ-Normdosierung (33,5 mg %) liegen deutlich (20 %) unter denen der Kontrollen. Die Verabfolgung einer zehnfachen und zwanzigfachen Dosierung von NFZ (67,0 mg % bzw. 134,0 mg %) ging, wie aus der graphischen Darstellung (Abb. 4) zu ersehen ist, mit eindeutigen Gewichtsverlusten einher. Die zwanzigfache Dosierung wirkte innerhalb von 14 Tagen letal; wurde die zehnfache Dosierung verabreicht (67,0 mg %), so starben während der Versuchszeit fünf Tiere, das erste zu Beginn der dritten Versuchswoche.

Abb. 4
GEWICHTSVERLAUF der TIERE des
FLINGGEFLÜGEL-VERSUCHES
mit NITROFURAZON

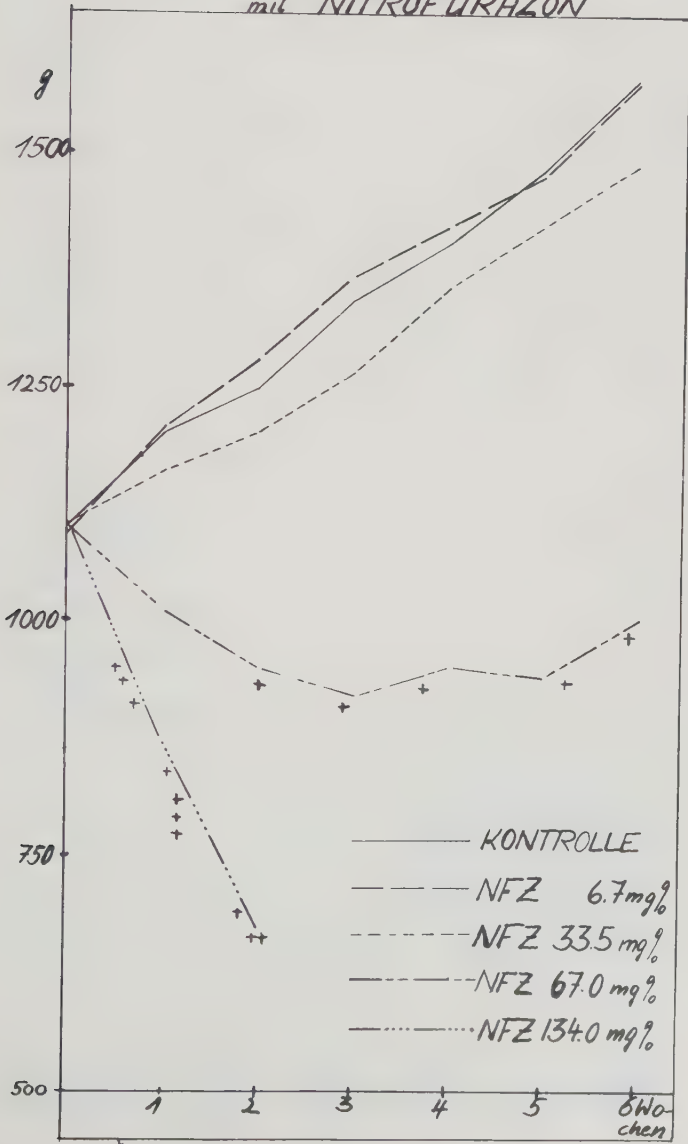


Abb. 5
GEWICHTSVERLAUF der TIERE des
FLUGGEFLÜGEL - VERSUCHES
mit NITROPHENID

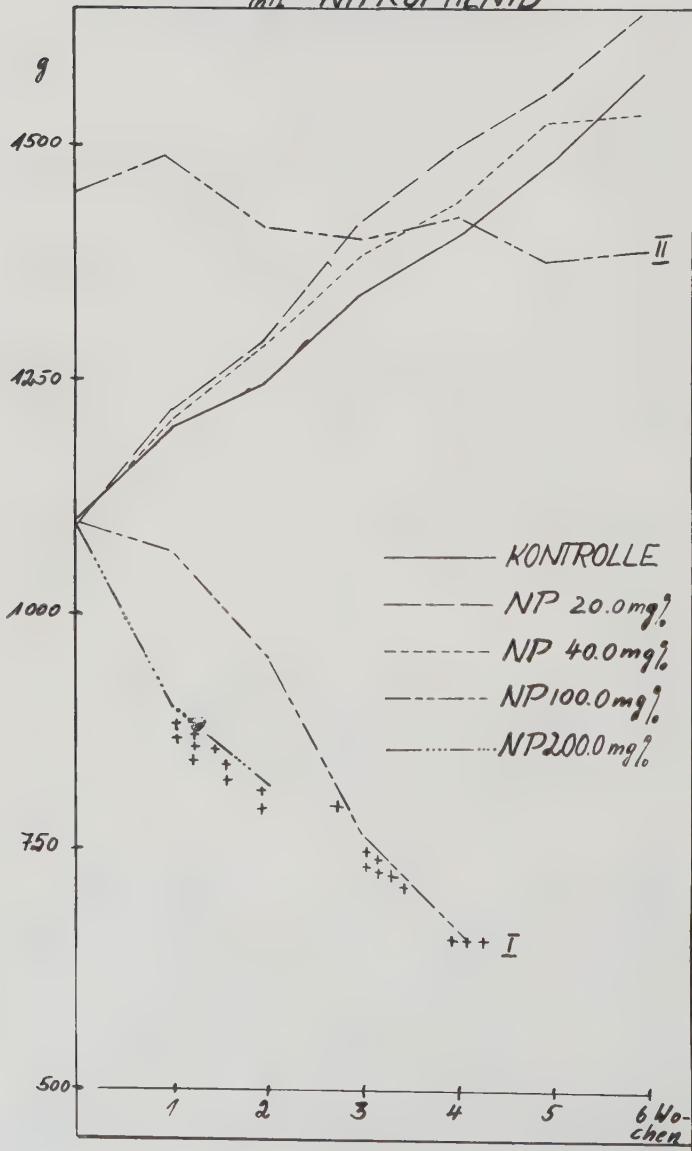


Abb. 6

GEWICHTSVERLAUF der TIERE des
FLINGGEFLÜGEL - VERSUCHES
mit NICARBAZIN

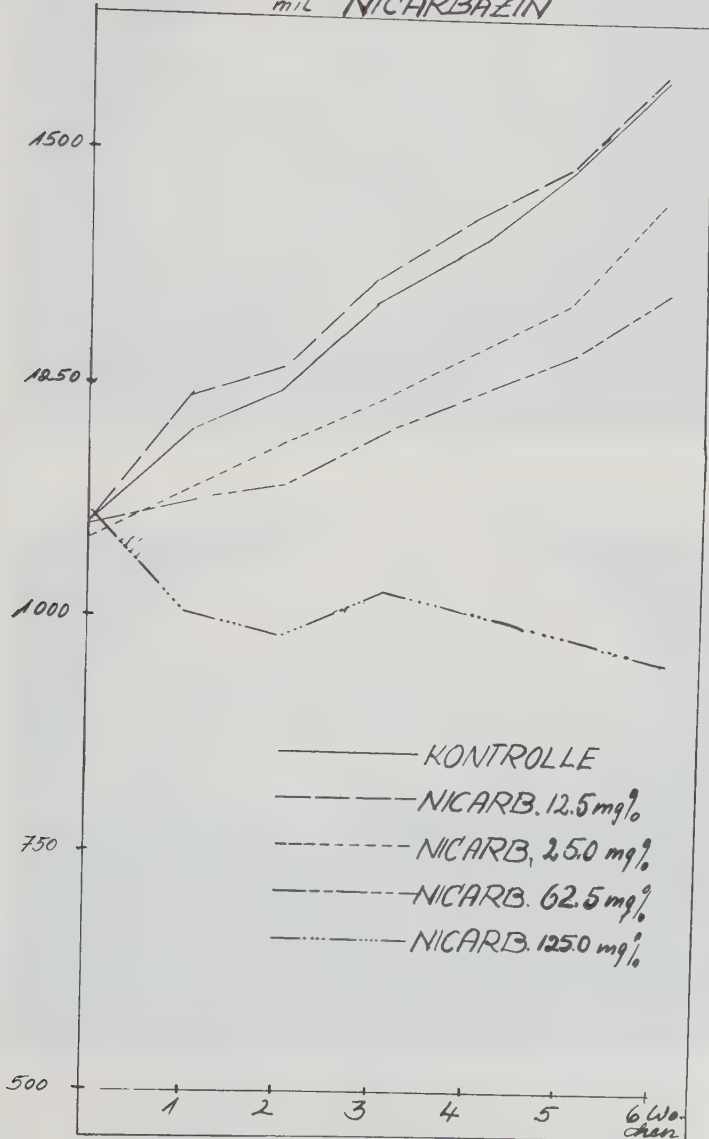




Abb. 11 und 12: Tiere aus der Gruppe 1d
(134,0 mg % Nitrofurazon)

Bei der Gruppe 1c, deren Futter 67,0 mg % NFZ enthielt, waren außer allgemeinen Symptomen wie gesträubtes Gefieder, Mattigkeit und Schlafsucht keine besonderen Erscheinungen feststellbar.

Die Dosierung von 134,0 mg NFZ verursachte auffällige Mattigkeit und Schläfrigkeit ab dem 3. Tag (Abb. 11, 12). Am 5. Tag stellte sich der erste Verlust ein. Einige Tiere starben ohne besondere Toxizitätserscheinungen, andere zeigten Haltungs- und Stellungsanomalien und nervöse Symptome. Die Hockstellung war häufig zu finden (Abb. 11). Gleichgewichtstörungen stellten sich bei drei Tieren am 5. Tag des Versuches ein; die Tiere kippten seitwärts um. Der Gang war schwankend, und die Tiere traten sich häufig mit dem einen Bein auf das andere (Abb. 12). Auf Bleistiftdruck an den Zehen reagierten sie erst, wenn ein starker Druck ausgeübt wurde. Bei dieser Dosierung konnten also deutlich Bewußtseins-, Bewegungs- und Empfindungsstörungen beobachtet werden, die auch durch die histologische Untersuchung des Gehirns bestätigt wurden. Zwei Tiere, welche die höchste NFZ-Dosierung erhalten hatten, wurden histologisch untersucht; der Befund sei hier wiedergegeben:

Tier Nr. 145:

Leber	Hochgradige Blutfülle aller Gefäße; Oedem und Dissoziation der Leberbalken; Eiweißzylinder in den Gallenkapillaren;
Niere:	Multiple Hämorrhagien verschiedenen Umfangs im Bereich des gesamten Nierenparenchyms; vacuoläre Entartung der Tubuliephithelien und Nekrosen;
Milz:	ohne Befund
Nerv und Gehirn:	Oedem ohne zellige Reaktion; geringgradig beginnende Entmarkung;
Dünndarm:	Landkartenähnlich verteilte Nekrosen und Hämorrhagien in der Schleimhaut

Tier Nr. 4598:

Leber:	Hyperämie, hochgradiges Leberoedem;
Niere:	Hochgradigste Hyperämie mit umfangreichem Blutaustritt, Tubulinephrose und Nekrose;
Milz:	ohne Befund;
Gehirn:	Ausgeprägtes Oedem;

Dünndarm: Hämorrhagien und Nekrosen der Schleimhaut;

Die gefundenen Leber- und Nierenveränderungen stehen in Einklang mit den von KRANTZ (20) aufgezeichneten Befunden bei Ratten nach sc. Injektion von Nitrofurazon.

β) Nitrophenid

Die Nitrophenid-Gruppe mit einer Dosierung von 200,0 mg % zeigte in der ersten Versuchswoche einen Verlust des Körpergewichtes von 17,3 %; innerhalb der zweiten Versuchswoche starben sämtliche Tiere dieser Dosierung.

Auch die fünffache NP-Dosierung (100 mg %, in der graphischen Darstellung (Abb. 5) mit I bezeichnet) äußerte sich in Gewichtsverlusten; aus dieser Gruppe starben sieben von 10 Tieren während der 4. Versuchswoche unter deutlichen Toxizitätssymptomen, die später dargelegt werden sollen.

Da die Dosierung von 100,0 mg % bei dem Kükenversuch ohne Todesfälle verlaufen war und sogar noch gute Gewichtsgewinne zu verzeichnen waren, wurde auch noch ein Zusatzversuch mit 10 Wochen alten Nichols-Küken über sechs Wochen angesetzt. Die Anfangsgewichte dieser Tiere lagen höher (1450 g), aber es galt hauptsächlich festzustellen, ob auch bei älteren Tieren tatsächlich Gewichtsverluste und Mortalität auftreten. Das Ergebnis ist aus Tabelle IV und Abbildung 5 (mit II gekennzeichnet) ersichtlich. Daraus geht hervor, daß während der ersten Versuchswoche nur noch ein durchschnittlicher Zuwachs von 40 g pro Tier erzielt wurde, was mit der plötzlich eingeschränkten Bewegungsfreiheit in den Batterien in Zusammenhang stehen könnte. Bei zwei Tieren waren aber bereits geringe Abnahmen zu verzeichnen. Ab zweiter Woche zeigte dieser Zusatzversuch ebenfalls Gewichtsverluste. Sie traten aber nicht so auffällig hervor wie im ersten Versuch. Bei Versuchsende stellte sich ein durchschnittlicher Verlust von 81 g/Tier heraus; bei drei Tieren waren am Versuchsende geringe Gewichtsgewinne festzustellen. Todesfälle waren bei diesem Zusatzversuch nicht aufgetreten. Diese Tatsache dürfte mit dem höheren Gewicht der in diesem Zusatzversuch verwendeten Tiere zusammenhängen. Sehr deutlich traten Toxizitätssymptome hervor, auf die später eingegangen werden soll.

Eine Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse von dem ersten Jungtierversuch und dem Zusatzversuch liegt vielleicht darin, daß die erste Versuchsgruppe stark mit Coccidiose befallen war, was zu Darm-

verletzungen führte; diese kamen nicht zur Ausheilung sondern vergrößerten sich, so daß möglicherweise eine verstärkte und ungehinderte Resorption von unverändertem NP für die Todesfälle verantwortlich zu machen ist. Als weitere Ursache für die Mortalität in dem ersten Versuch kommt in Betracht, daß die Tiere zu Beginn der vierten Versuchswoche rund ein Drittel ihres Körpergewichtes verloren hatten und infolge Kachexie starben; die Tiere waren zu Skeletten abgemagert. Es ist schwer festzustellen, ob die Gewichtsverluste durch die toxischen Effekte oder durch die nervöse Störung und geringe Futteraufnahme verursacht wurden.

Alle Tiere, die mit den hohen NP-Dosen gefüttert wurden, zeigten sehr ausgeprägte klinische Erscheinungen: Die Gruppe 2c (100,0 mg % NP, Abb. 14), Gruppe 2d (200,0 mg NP, Abb. 13), und die Gruppe des Zusatzversuches mit 100,0 mg NP im Futter.

Bei der Gruppe 2d (200,0 mg % NP) stellten sich nach fünf Tagen Versuchsdauer dieselben Symptome ein, die beim Kükenversuch näher beschrieben sind. Besonders deutlich waren Haltungs- und Stellungsanomalien (Abb. 13) und hochgradige Erregungszustände. Die spastischen Bewegungsstörungen äußerten sich sowohl tonisch wie klonisch und endeten teils in Kovulsionen und epileptoiden Krämpfen. Hyperästhesien wechselten mit Anästhesie ab. Sämtliche Tiere starben während der zweiten Versuchswoche. Die klinischen Erscheinungen stellten sich in beiden Gruppen, die 100,0 mg % NP im Futter erhielten, am 9. Versuchstag ein; sie entsprachen den oben beschriebenen Symptomen.

Zwei Tiere der Gruppe 2d (200,0 mg % NP) wurden histologisch untersucht:

Tier Nr. 48:

Leber:	Oedem mit Dissoziation der Leberzellbalken und geringgradiger Aktivierung des RES;
Niere:	Subcapsuläre Blutungen, Tubulinephrose und kleine, herdförmige Nekrosen;
Milz:	Neubildung von Reaktionszentren;
Nerv:	Ohne Befund;
Gehirn:	ausgeprägtes Oedem;

Tier Nr. 435:

Leber:	Ohne Befund;
Niere:	Hyperämie mit herdförmiger Erythrodiapedese, Tubulinephrose in geringem Umfang;

Milz: ohne Befund
Nerv: ohne Befund
Gehirn: keine Entmarkung, aber Oedem.

Die übrigen Gruppen 2a (20,0 mg % NP) bzw. 2b (40,0 mg % NP) zeigten keine Veränderungen. Diese Dosierungen dürften als unschädlich bezeichnet werden, zumal die Zunahmen der Gruppe 2b ständig über denen der Kontrollen lagen. Unerklärlicherweise konnte in der letzten Versuchswoche nur 5 g Zuwachs erzielt werden.

g) Nicarbazin

In der Nicarbazingruppe, die das Doppelte der Normal-Dosierung (25,0 mg %) erhalten hatte, wurde ein auffällig schlechter Zuwachs festgestellt. Man kann aber trotz dieser geringen Zunahmen (Tabelle IV und Abb. 6) auf Grund des uneinheitlichen Tiermaterials und der fehlenden Wiederholungen nicht von Toxizität sprechen, zumal dieselbe Dosierung bei dem Kükenversuch bessere Zunahmen als bei den Kontrollen ergab (siehe Tabelle II und Abb. 3).

Der um 43,8 % geringere Zuwachs bei der fünffachen NC-Dosierung (62,5 mg %) muß dagegen wohl als Toxizitätssymptom gewertet werden; ebenso ist der Gewichtsverlust der Gruppe 3d (125,0 mg % NC) als Toxizitätsfolge zu betrachten. Die plötzlich von der zweiten auf die dritte Versuchswoche auftretende Gewichtszunahme dieser Gruppe, die in Abbildung 6 in Erscheinung tritt, ist durch die Schlachtung der drei leichtesten Tiere zu Analysenzwecken verursacht; die Gewichtskurve würde sonst fast geradlinig abfallen.



Abb. 13

Ein Tier aus der Gruppe 2d (200 mg % Nitrophenid)



Abb. 14 und 15
Tiere aus der Gruppe 2c (100 mg % Nitrophenid)

Besondere Toxizitätssymptome, abgesehen von Gewichtsverlust und Allgemeinsymptomen wie gesträubtes Gefieder, Mattigkeit und geringe Futteraufnahme, waren auch bei der höchsten NC-Dosierung (125,0 mg %) nicht bemerkbar.

II. Analytischer Teil

Da aus der Literatur entnommen werden konnte, daß Coccidiostatica-rückstände in den Organen nur bei Zufütterung von Nicarbazin zu erwarten waren, wurde das Schwergewicht der Rückstandsbestimmung auf Nicarbazin gelegt. Eingehende Untersuchungen auf Rückstände von NFZ und NP in Muskel, Leber, Darm und Niere, die in diesem Institut von BRONSCH und NIESAR durchgeführt wurden, bestätigten die Ergebnisse anderer Untersucher. Selbst bei den höchsten, hier verwendeten Dosierungen (134 mg % NFZ und 200 mg % NP im Futter) konnten in keinem der untersuchten Organe analytisch nachweisbare Mengen von NFZ bzw. NP gefunden werden.

Nicarbazinbestimmung

Nicarbazin ist eine Komplexverbindung von Dinitrocarbanilid (DNC) und Hydroxydimethylpyrimidin (HDP). Da Nicarbazin im wässrigen Medium, also auch im Darm, gespalten wird, wurde jede Komponente getrennt analysiert. Es konnte nämlich von dem Gehalt des einen Nicarbazin-Anteiles (z. B. von DNC) nicht auf die Menge des anderen NC-Anteiles (HDP) geschlossen werden, da die Resorptions- und Ausscheidungsgeschwindigkeiten für beide Verbindungen sehr unterschiedlich sind.

1. Auswahl der Tiere für die Analysen

Von dem Kükenversuch wurden aus jeder Nicarbazin-Gruppe in 14-tägigem Abstand zwei bis drei Tiere und bei Versuchsende je Gruppe fünf Tiere mit vergleichbarem Gewicht geschlachtet, Gewebeproben entnommen und in ihnen Rückstandsbestimmungen durchgeführt. Um die Ausscheidungs- und Eliminierungsgeschwindigkeit des NC aus dem Organismus festzustellen, wurde an zwei Tiere jeder Gruppe am Versuchsende einen Tag und an zwei weitere Tiere zwei Tage Kontrollfutter ohne Nicarbazin verabreicht. Diese Tiere wurden ebenfalls geschlachtet und auf DNC und HDP untersucht.

Bei dem Junggeflügelversuch wurden zu Versuchsende sechs Tiere je Gruppe geschlachtet. Zwei Tiere jeder Gruppe wurden nach eintägiger und zwei weitere Tiere nach zweitägiger Kontrollfütterung (ohne NC) geschlachtet und deren Organe auf NC-Rückstände untersucht.

Rückstandsbestimmungen wurden durchgeführt:

- a) sofort nach der Schlachtung (Frischwerte)
- b) nach 24-stündiger Kühlschrankaufbewahrung bei $+4^{\circ}\text{C}$

Außerdem wurden noch zusätzlich durchgeführt:

- a) Abbauprobversuche bei 37°C
- b) Bratversuche
- c) Tiefgefrierversuche

2. Dinitrocarbanilidbestimmung

a) Prinzip

Für die quantitative Bestimmung wurde die bekannte Methode zum Nachweis von Nitrogruppen herangezogen. Bei Anwesenheit aromatischer Nitrogruppen erhält man durch Zugabe von Alkali zum Lösungsmittel eine gelbe Farbe, deren Intensität colorimetrisch bestimmt werden kann.

- Reagentien:
- 1. Dimethylformamid
 - 2. Aethylacetat
 - 3. Chloroform
 - 4. wässrige Natriumbicarbonatlösung 10 %
 - 5. wasserfreies Natriumsulfat
 - 6. 60 %ige wässrige Natriumhydroxydlösung
 - 7. alkoholische Natriumhydroxydlösung;
0,5 ml der 60 %igen wässrigen NaOH-Lösung werden ad 100 ml mit 95 %igem Alkohol aufgefüllt. Die alkoholische NaOH-Lösung muß stets frisch hergestellt werden und vollkommen klar sein.
 - 8. Eisessig
 - 9. Eichlösung
Herstellung: 10 mg Nicarbazin werden in 100 ml Dimethylformamid im Wasserbad (80°C) gelöst. Es sind dann je ml Lösung 100 µg Nicarbazin enthalten.

b) Aufarbeitung der Organe

Der DNC-Gehalt wurde in Muskel, Leber, Niere und Darm ermittelt. Von den Geweben Muskel, Leber und Darm wurden 10 g Frischsubstanz, von der Niere 5 g abgewogen und nach der Methode von PORTER (54) bearbeitet. Sie wurden nach Zugabe von 20 ml Aethylacetat + 10 ml Chloroform im Homogenisator fein zerschlagen, in ein Zentrifugen-

glas überführt und 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Das Aethylacetat-Chloroformgemisch wurde in einen Erlenmeyerkolben filtriert. Das Gewebe wurde nochmals mit 20 ml Aethylacetat + 10 ml Chloroform versetzt, gut geschüttelt und 5 min zentrifugiert. Diese Extraktionsflüssigkeit wurde zu der ersten hinzufiltriert.

Da der erhaltene Extrakt - wahrscheinlich durch organische Säuren des Gewebes -sauer war, mußte er mit 10 ml einer 10 %igen Na-bicarbonatlösung versetzt, durchgeschüttelt und im Schütteltrichter wieder getrennt werden. Das Aethylacetat-Chloroformgemisch wurde dann mittels Na-Sulfat entwässert, in einen Rundkolben filtriert und auf dem Wasserbad (60°C) mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe zur Trockene gebracht.

Der gelbgrüne Rückstand wurde dann in 10 ml alkoholischer NaOH-Lösung gelöst, fünf Minuten in Eiswasser gestellt und anschließend in ein Reagenzglas filtriert. Von dem klaren Filtrat wurde genau 1 ml entnommen, in eine 1 cm-Küvette überführt und mit 1 ml der alkoholischen NaOH-Lösung (1 : 1) verdünnt. Anschließend wurde die Extinktion im Eppendorf-Photometer bei 436 m μ im alkalischen Bereich und nach Zugabe von zwei Tropfen Eisessig auch im sauren Bereich gemessen. Die im sauren Milieu gefundene Extinktion wurde von der des alkalischen subtrahiert. Das so erhaltene ΔE ist ein Maß für den DNC-Anteil von Nicarbazin, da durch das Ansäuern die durch das Nicarbazin hervorgerufene Gelbfärbung zu Verschwinden gebracht wird.

c) Umrechnung der Extinktion auf Gewichtswerte

Aus Vorversuchen war bekannt, daß sich NC-Zusätze zu Organhomogenaten nicht quantitativ (nur zu 50 - 60 %) wieder extrahieren lassen, da das NC in besonderem Maße anscheinend adsorptiv festgehalten wird. Ähnliche Befunde wurden auch bei der NC-Bestimmung in Futtermittelproben erhoben. Es waren daher Eichkurven zu erstellen, und zwar für jedes Organ getrennt, um von den erhaltenen Extinktionen auf Gewichtswerte DNC schließen zu können.

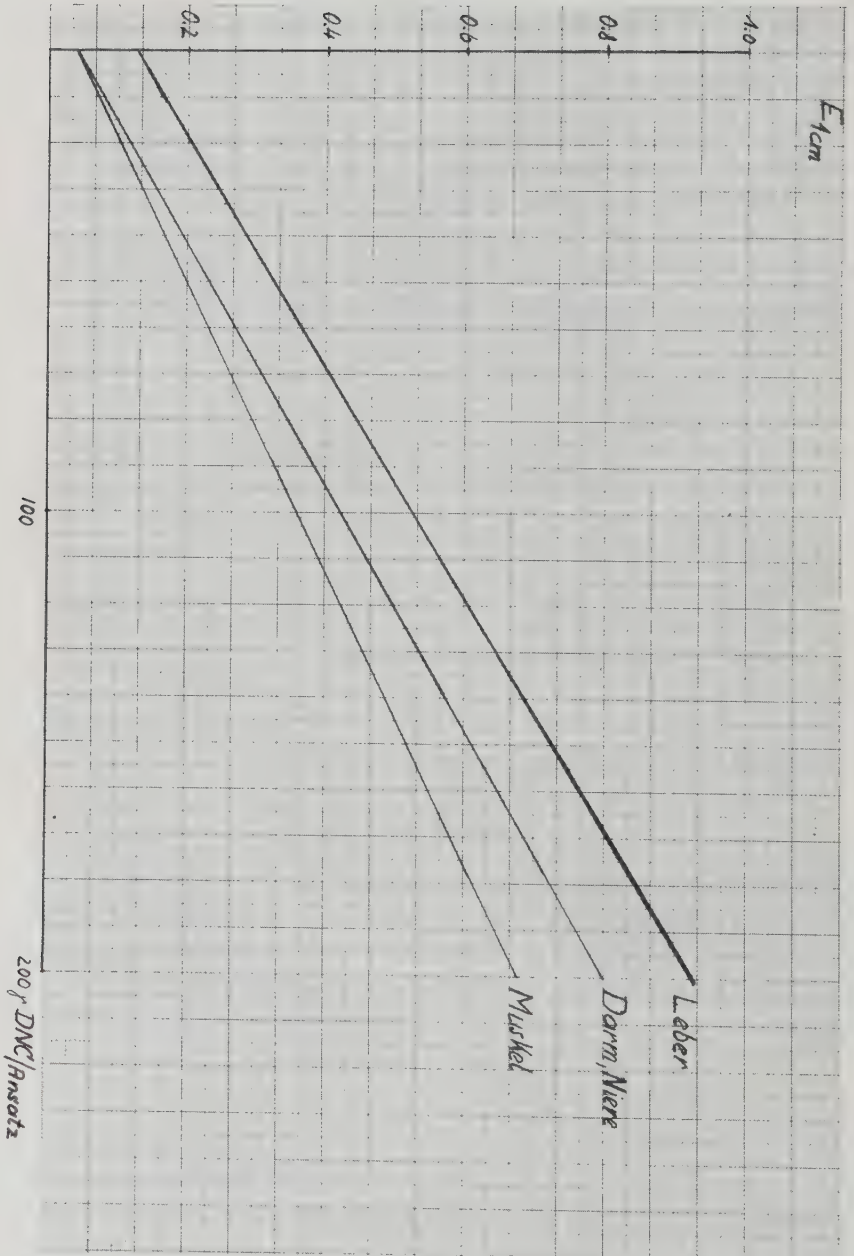
Dazu wurde eine Eichlösung mit 100 μ g DNC/ml hergestellt.

10 g bzw. 5g der einzelnen Gewebe, die von Kontrolltieren entnommen worden waren, wurden in einer Reibschale mit dem Mörser fein zerkleinert. Dann wurden 0,0 ml, 0,2 ml (= 20 μ g DNC), 0,4 ml, 0,6 ml und mehr Eichlösung zu den Gewebeproben gegeben und gut durchgemischt. Anschließend wurde das mit Eichlösung versetzte Gewebe in der oben beschriebenen Weise extrahiert und die Extinktionen der verschiedenen Zusätze festgestellt. Auf diese Weise wurden die Blind-

werte der einzelnen Gewebe und die Extinktionen für die verschiedenen großen Zusätze der Eichlösung ermittelt und graphisch dargestellt. Aus den graphischen Darstellungen (Eichkurven) kann so jeder Wert direkt entnommen werden (S. 40).

Zur Ermittlung der Fehlergrenze des Verfahrens wurden mehrere Hühnerlebern (zusammen etwa 120 g) im Starmix zerkleinert. Von dem so erhaltenen Leberbrei wurden 10 Portionen von je 10 g abgewogen, mit 152 μ NC (= 100 μ DNC) versetzt und wie beschrieben aufgearbeitet. Mit den anderen Organen wurde entsprechend verfahren.

Die Streuung der erhaltenen Einzelwerte ist für alle Organe etwa gleich groß. Sie wurde nach der Formel



$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{(n - 1)}}$$

$\sum d^2$ = Summe der ins Quadrat erhobenen Differenzen zum Mittelwert

n = Anzahl der Differenzen

$(n-1)$ = Zahl der Freiheitsgrade

zu 5,3 μ /Ansatz, also 5,3 % errechnet. Daraus ergibt sich eine Nachweisgrenze für DNC von durchschnittlich 1 μ /g Frischgewicht.

3. Bestimmung des Hydroxydimethylpyrimidins (HDP), des wasserlöslichen Nicarbazinanteiles

a) Prinzip und Methode

Die HDP-Bestimmung beruht auf der ultravioletten Absorption des HDP in Säuren. Der HDP-Gehalt wurde in Muskel, Leber, Darm und Niere ermittelt. Genau 5 g der einzelnen Organe wurden abgewogen und mit 6 ml 0,6 n Perchlorsäure (5,2 ml konzentrierter HClO_4 ad 100,0 ml mit H_2O aufgefüllt) versetzt. Dann wurde die Gewebeprobe im Homogenisator fein zerschlagen und das Homogenat in ein Zentrifugenglas überführt und 5 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. War die überstehende Flüssigkeit klar, so wurde sie in eine 1 cm Küvette überführt und ihre Extinktion im Eppendorf-Photometer gegen H_2O bei den Filtern 313 $\text{m}\mu$ und 334 $\text{m}\mu$ gemessen. War die überstehende Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren trüb, so wurde sie 1 : 1 mit absolutem Alkohol verdünnt und 10 min lang in Eiswasser gestellt. Dann wurde filtriert und gemessen. Die Berechnung erfolgte, eventuell unter Berücksichtigung der Alkohol-Verdünnung anhand der entsprechenden Eichkurve (S. 44).

b) Aufstellen der Eichkurve und Umrechnung der Extinktionen auf Gewichtswerte

Zur Herstellung einer Eichkurve war es zunächst nötig, das Hydroxydimethylpyrimidin präparativ darzustellen. Dies geschah nach der Vorschrift von EVANS (58) : Zu 100 g Harnstoff, der in 160 ml Alkohol gelöst ist, wird nach dem Erkalten 100 g Acetylaceton und 16 ml konzentrierte H_2SO_4 zugegeben. Dann läßt man die Lösung abkühlen, stellt sie zwei Stunden in eine Kältemischung und versetzt einige ml des

Reaktionsgemisches mit demselben Volumen absolutem Aether und impft mit den erhaltenen Kristallen die erkaltete Lösung. Das Sulfat beginnt sofort in reichlichen Mengen auszufallen. Nach drei bis vier Stunden wird es auch beim Umschütteln nicht mehr vermehrt. Die Kristalle werden abgesaugt und die Mutterlauge mit gleichem Volumen Aether versetzt. Nach weiteren zwei Stunden werden die Kristalle wieder abgesaugt. Anschließend wird zweimal aus Alkohol umkristallisiert. Der Schmelzpunkt liegt bei 209°C , was mit den Angaben von EVANS (58) übereinstimmt.

Mit dem so rein dargestellten Hydroxydimethylpyrimidin wurde die Eichkurve folgendermaßen aufgestellt: 20, 40, 60 und mehr μ HDP wurden in HClO_4 (0,6 n) - H_2O (1 : 1) (Volumen 10 ml) gelöst, die Extinktion bei Filter 313 $\text{m}\mu$ und Filter 334 $\text{m}\mu$ gemessen und die Differenz (Extinktion 313 $\text{m}\mu$ - Extinktion 334 $\text{m}\mu$) graphisch dargestellt.

Dann wurden von den einzelnen Geweben die Extinktionen (= Blindwerte) folgendermaßen ermittelt: 5 g Gewebe (Kontrolltiere) wurden mit 6 ml 0,6 n Perchlorsäure (Endvolumen 10 ml) versetzt, homogenisiert, zentrifugiert und die Extinktionen bei 313 $\text{m}\mu$ und 334 $\text{m}\mu$ gemessen und die Differenz berechnet. Das arithmetische Mittel der Differenzen der Blindwertextinktionen ist folgendes:

	Muskel	Leber	Darm	Niere
Extinktion	0,060 $\pm$ 0,024	0,690 $\pm$ 0,02	0,205 $\pm$ 0,03	0,850 $\pm$ 0,018

Wird nun Gewebe, in dem HDP enthalten ist, in der oben angeführten Weise aufgearbeitet und die Differenz der beiden Extinktionen (Extinktion 313 $\text{m}\mu$ - Extinktion 334 $\text{m}\mu$) festgestellt, so muß von dieser Differenz der Blindwert der einzelnen Organe subtrahiert und dann aus der Eichkurve der zugehörige HDP-Wert abgelesen werden. Dieser Wert entspricht 5 g Gewebe und wird auf 1g Gewebe umgerechnet.

Die Ermittlung der Gewichtswerte sei an folgendem Beispiel gezeigt: Extinktion des Muskels von Tieren, die

Nicarbazin erhalten hatten, bei Filter 313 $\text{m}\mu$ 0,500

Extinktion desselben Muskels bei Filter 334 $\text{m}\mu$ 0,260

Differenz (Extinktion 313 $\text{m}\mu$ - Extinktion 334 $\text{m}\mu$) 0,240

Extinktion des Muskels von Kontrolltieren

(ohne Nicarbazin = Blindwert) 0,060

Differenz (313-334) - Blindwert = 0,240 - 0,060 = 0,180

Von dieser Extinktion 0,180 wird aus der Eichkurve der zugehörige Wert abgelesen. Er beträgt 48 μ / 5 g;
1 g Muskel enthält also 9,6 μ HDP.

Die Fehlergrenze der HDP-Bestimmung wurde in gleicher Weise ermittelt wie es schon bei der DNC-Bestimmung beschrieben worden ist. Die mittlere Streuung errechnet sich hier zu $\pm 9,1 \%$. Die Nachweisgrenze liegt bei 2 μ / g Frischgewicht.

4. Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle V a, b, c sind die ermittelten DNC- und HDP-Gehalte vom Kükenversuch, in Tabelle VI die vom Jungtierversuch zusammengestellt. Bei den in 14-tägigem Abstand geschlachteten und untersuchten Tieren ist der Durchschnittsgehalt in μ / g Frischsubstanz angegeben; bei den zu Versuchsende ermittelten Gehalten ist der Mittelwert aufgeführt und nach der Formel

$$m = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}} \quad \text{xx}$$

die mittlere Abweichung errechnet worden.

Aus den Ergebnissen der in 14-tägigem Abstand geschlachteten Tiere geht hervor, daß die Rückstände in den Organen bei den verschiedenen NC-Dosierungen nicht kumulieren, sondern stufenweise abnehmen. Dieser Befund hängt damit zusammen, daß die Küken mit zunehmendem Gewicht weniger Futter/kg Körpergewicht aufnehmen. Außerdem dürfte sich der Organismus auf eine schnellere Ausscheidung oder rascheren Umbau einstellen, oder es könnte das vom Arsen her bekannte Phänomen der zunehmend verschlechterten Resorption durch die Darmschleimhaut an Bedeutung gewinnen. Ein Vergleich zwischen aufgenommener Menge Nicarbazin und wiedergefundenen DNC und HDP läßt sich nicht anstellen, weil eine Einzelfütterung der Tiere nicht möglich war. Die gefundenen Werte schwankten innerhalb der einzelnen Dosierungen bei gleichem Schlachtzeitpunkt oft stark. Sie hängen zu sehr von der Menge des aufgenommenen Futters und dem Zeitpunkt der Schlachtung

xxVergl. S. 41

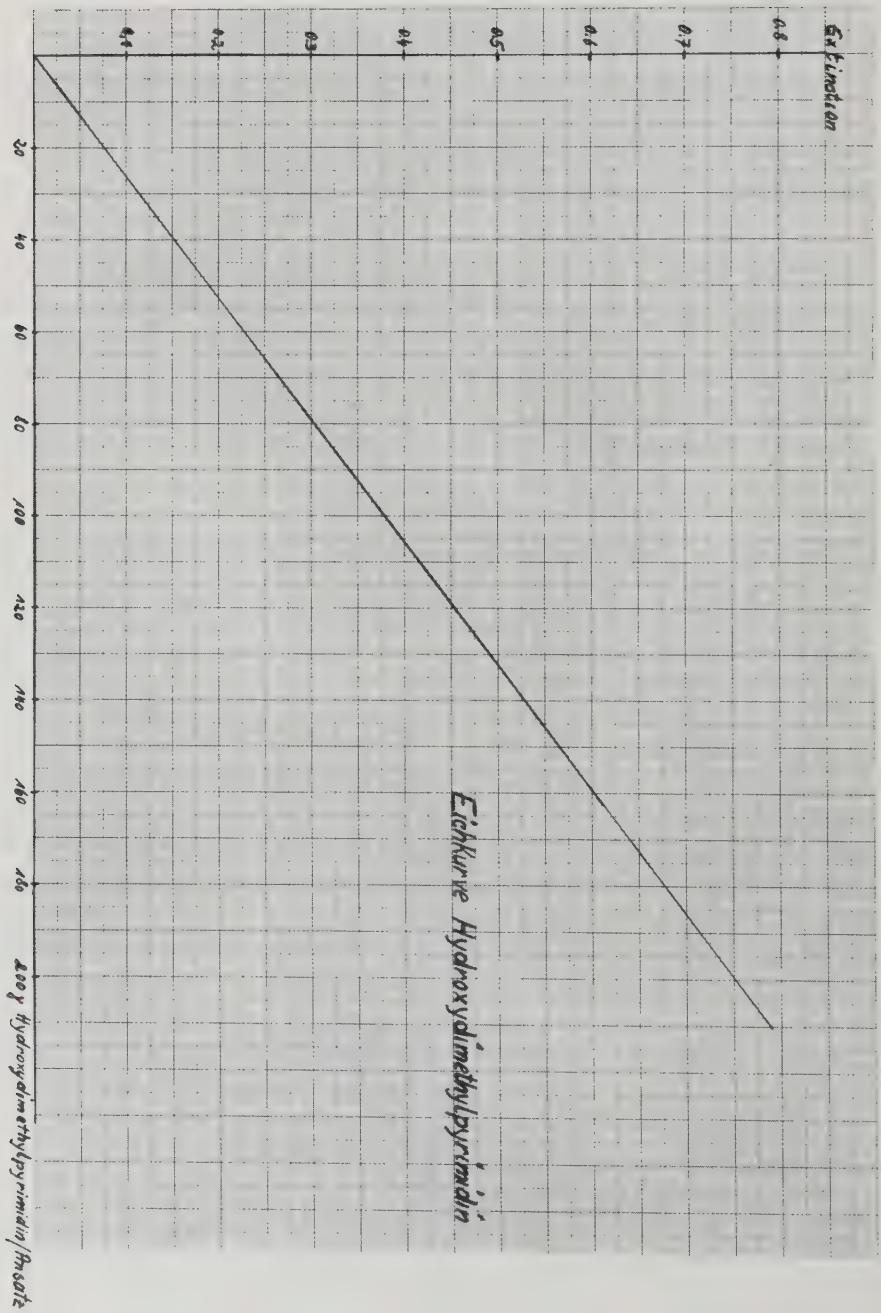


Tabelle V a

Kükenversuch 12,5 mg % Nicarbazin

Schlachtung am ... Versuchstag	DNC-Gehalte in μ /g Frischsubstanz				HDP-Gehalte in μ /g Frischsubstanz			
	Muskel	Leber	Darm	Niere	Muskel	Leber	Darm	Niere
14.	3,66	7,2	10,0	-	1,4	3,2	5,6	10,0
28.	5,00	21,5	17,6	6,00	1,4	0,0	8,0	14,4
42.	2,30	15,7	13,9	16,80	1,9	0,0	2,5	5,6
56.	3,20 $\pm$ 0,24	16,2 $\pm$ 0,30	10,0 $\pm$ 0,29	2,4 $\pm$ 0,0	8,0 $\pm$ 4,4	0,0	3,0 $\pm$ 3,0	4,1 $\pm$ 4,1
1 Tag Kontroll- futtermittel- abreichung	0,00	1,4	0,00	0,00	0,4	0,0	0,0	0,0
2 Tage Kontroll- futtermittel- abreichung	0,00	0,00	-	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle V b

Kükenversuch 25,0 mg % Nicarbazin

Schlachtung am ... Versuchstag	DNC-Gehalte in $\mu\text{r/g}$ Frischsubstanz				HDP-Gehalte in $\mu\text{r/g}$ Frischsubstanz			
	Muskel	Leber	Darm	Niere	Muskel	Leber	Darm	Niere
14.	14,5	53,5	32,7	19,4	2,7	3,0	4,6	11,6
28.	9,5	39,6	27,9	11,4	5,0	5,0	5,0	9,0
42.	7,5	35,7	28,5	7,8	1,3	0,0	5,1	8,0
56.	6,7 $\pm$ 0,26	30,5 $\pm$ 3,16	26,5 $\pm$ 1,51	5,2 $\pm$ 1,20	2,5 $\pm$ 1,1	2,3 $\pm$ 0,0	5,6 $\pm$ 0,0	8,2 $\pm$ 2,2
1 Tag Kontroll- futtermittel- reichung	1,9	6,6	5,4	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
2 Tage Kontroll- futtermittel- reichung	0,00	3,0	1,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle V c

Kükenversuch 62,5 mg % Nicarbazin

Schlachtung am ... Versuchstag	DNC-Gehalte in γ /g Frischsubstanz				HDP-Gehalte in γ /g Frischsubstanz			
	Muskel	Leber	Darm	Niere	Muskel	Leber	Darm	Niere
14.	29,8	62,8	16,7	31,4	9,0	-	-	-
28.	12,7	62,8	47,3	18,0	6,4	2,0	3,2	28,0
42.	23,0	82,7	ca.80,0	35,4	5,2	1,4	2,0	19,6
56.	17,0±0,21	77,0±5,69	ca.80,0	27,0±2,0	3,4±1,73	0,0	9,0±1,83	13,2±0,0
1 Tag Kontroll- futtermittel- reichung	8,1	45,2	29,8	12,5	1,8	0,0	0,0	0,0
2 Tage Kontroll- futtermittel- reichung	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle VI

Jungtierversuch

Nicarbazin im Futter	Gewebe	DNC-Gehalte in μg Frischsubstanz		HDP-Gehalte in μg Frischsubstanz			
		nach 6-wöch. NC-Verab- reichung	nach 1-tägi- ger Kontroll- futtergabe	nach 6-wöch. nach 1-tägi- ger Kontroll- futtergabe	nach 2-tägi- ger Kontroll- futtergabe		
12,5 mg %	Muskel	1,2 $\pm$ 0,25	0,0	0,00	4,5 $\pm$ 0,14	0,6	0,0
	Leber	13,9 $\pm$ 0,70	2,0	0,00	2,8 $\pm$ 2,51	0,0	0,0
	Darm	8,1 $\pm$ 0,19	1,8	0,00	14,0 $\pm$ 1,50	0,0	0,0
	Niere	0,6 $\pm$ 0,14	0,0	0,00	10,8 $\pm$ 0,20	0,0	0,0
25,0 mg %	Muskel	4,9 $\pm$ 1,07	0,9	0,00	2,7 $\pm$ 0,20	1,6	0,0
	Leber	20,7 $\pm$ 0,40	6,8	0,00	14,2 $\pm$ 2,53	1,4	0,0
	Darm	12,4 $\pm$ 0,00	3,8	0,00	-	-	-
	Niere	3,2 $\pm$ 1,20	0,2	0,00	19,0 $\pm$ 10,0	6,0	0,0
62,5 mg %	Muskel	8,7 $\pm$ 2,31	-	0,00	3,3 $\pm$ 0,26	-	0,0
	Leber	46,7 $\pm$ 3,21	-	0,00	3,0 $\pm$ 1,3	-	0,0
	Darm	35,8 $\pm$ 3,20	-	0,00	2,6 $\pm$ 1,71	-	0,0
	Niere	33,4 $\pm$ 4,83	-	0,00	21,0 $\pm$ 1,82	-	0,0
125,0 mg %	Muskel	15,9 $\pm$ 2,00	-	0,00	6,9 $\pm$ 0,23	-	0,0
	Leber	102,6 $\pm$ 3,89	-	0,30	3,0 $\pm$ 1,64	-	0,0
	Darm	500 - 800	-	0,00	2,3 $\pm$ 0,22	-	0,0
	Niere	56,6 $\pm$ 7,16	-	0,00	26,3 $\pm$ 10,1	-	0,0

nach der Futteraufnahme ab: deshalb wurde die Schlachtung einheitlich zwischen 8⁰⁰ und 9⁰⁰ morgens vorgenommen. Ein Unterschied des Rückstandgehaltes zwischen Hähnchen und Hennen konnte nicht registriert werden.

Die Ergebnisse der Schlachtung am 56. Versuchstag zeigen besonders bei der DNC-Komponente deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Dosierungen. Bei der zweifachen Nicarbazindosierung wurden auch ziemlich genau die doppelten Mengen der Normdosierungen gefunden. Für die fünffache Dosierung stimmt dieses Verhältnis annähernd.

Die Werte aus Tabelle VI (Jungtierversuch) besagen, daß die Rückstände in den Geweben bei den dem Kükenversuch entsprechenden Dosierungen geringer sind. Der Grund mag darin liegen, daß die als Küken bezeichneten Tiere im Alter von 8 Wochen ungefähr denselben Verzehr haben wie Jungtiere mit 15 - 18 Wochen; sie nehmen also annähernd die gleiche Menge Nicarbazin auf. Bei den als Küken (8 Wochen alt!) bezeichneten Tieren verteilt sich das aufgenommene Nicarbazin nur auf ca. 900 bis 1150 g Körpersubstanz, bei den Jungtieren aber auf 1400 bis 1600 g Körpergewicht.

Ein Vergleich mit den von PORTER (54) gefundenen Werten bei seinen Rückstandsbestimmungen kann nicht angestellt werden, weil in der Arbeit keine Eichkurven angegeben sind.

Deutlich ergibt sich aus den Ergebnissen, daß bei allen Tieren, denen das NC 6 bzw. 8 Wochen mit dem Futter verabreicht wurde, nach zweitägiger Gabe von NC-freiem Futter weder DNC noch HDP nachgewiesen werden konnte. Dieses Resultat spricht für sehr rasche Eliminierung und stimmt mit den Berichten PORTERS (54) überein.

Die Gewebegehalte, die nach eintägiger Kontrollfuttergabe gefunden wurden, deuten ebenfalls auf rasche Ausscheidung. In der folgenden Tabelle sind die Prozentsätze der noch vorhandenen Nicarbazinanteile (1 Tag Kontrollfuttergabe) wiedergegeben.

Tabelle VII

Dosierung	DNC-Gehalte nach 1 Tag Kontrollfutter in % der am 56. Versuchstag er- mittelten Werte					HDP-Gehalte nach 1 Tag Kontrollfutter in % der am 56. Versuchstag er- mittelten Werte			
	Muskel	Leber	Darm	Niere		Muskel	Leber	Darm	Niere
NC 12,5 mg %	0,0	19,4	0,0	0,0		5,0	0,0	0,0	0,0
NC 25,0 mg %	28,3	21,6	20,4	15,9		0,0	0,0	0,0	0,0
NC 62,5 mg %	47,6	58,7	-	46,3		52,9	0,0	0,0	0,0

Für den Jungtierversuch gilt die Tabelle VIII

NC	12,5 mg %	0,0	14,4	20,4	0,0	13,3	0,0	0,0	0,0
NC	25,0 mg %	18,4	32,8	30,6	6,2	59,6	10,0	-	33,3

5. Kùhlschrank- und Gefrierversuche

Von den Gruppen, die 12,5 bzw. 25,0 mg % NC mit dem Futter erhielten, wurden Muskelproben frisch verarbeitet. Eine zweite Muskelprobe wurde 24 Stunden im Kùhlschrank bei +4°C aufbewahrt, und eine dritte Muskelprobe wurde mehrere Tage (bis zu 14 Tagen) in den Tiefgefriererraum (-10°C) gebracht und dann analysiert.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß sowohl 24-stündige Aufbewahrung im Kùhlschrank als auch längeres Einfrieren der Muskelproben keine Verringerung der DNC und HDP-Gehalte im Muskel zur Folge hatte. Die gefundenen Gehalte nach dieser Aufbewahrung stellen praktisch die Frischwerte dar.

DNC-Gehalte in g/g Muskel frisch verarbeitet	DNC-Gehalte in g/g Muskel nach 24-stünd. Kùhl- schrankaufbewahrung	DNC-Gehalte g/g Muskel der Gefrier- versuche
7,8	8,1	7,6
HDP-Gehalte in g/g Muskel frisch verarbeitet	HDP-Gehalte in g/g-Muskel nach 24-stünd. Kùhl- schrankaufbewahrung	HDP-Gehalte g/g Muskel der Gefrier- versuche
1,5	1,6	1,5

6. Abbauversuche mit Leber und Muskel

Von Leber und Muskel wurde das Abbauvermögen für DNC und HDP getestet. Es wurden dazu 10 g Gewebe mit 20 ml Phosphatpuffer pH 7,2 versetzt und im Homogenisator fein zerschlagen. Diese breiartigen Gewebe wurden in ein Zentrifugenglas überführt und über 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C belassen.

Gleichzeitig wurde eine Vergleichsprobe ohne und mit Phosphat-Puffer angesetzt, die sofort analysiert wurde. Nach 24-stündiger Aufbewahrung im Brutschrank wurden zu dem Gewebeprei 30 ml Aethylacetat-Chloroform-Gemisch (2 : 1) gegeben, gut geschüttelt und 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Die überstehende Phosphatpufferlösung wurde dann abgesaugt und das Extraktionsgemisch in einen

Erlenmeyerkolben gefiltert. Dem Geweberückstand wurde der Phosphatpuffer wieder zugesetzt und nochmals mit 30 ml Aethylacetat-Chloroformgemisch (2 : 1) extrahiert. Die beiden Filtrate wurden nach der weiter oben angegebenen Methode verarbeitet.

Weder im Muskel noch in der Leber konnte nach 24-stündiger Aufbewahrung bei 37°C eine Verminderung der DNC- und HDP-Gehalte registriert werden, so daß das Abbauvermögen dieser Organe für NC gering zu sein scheint.

7. Bratversuche

Abschließend wurde mit verschiedenen Brustmuskeln und Lebern untersucht, welcher DNC-Anteil bei der Zubereitung (durch Braten) zerstört wird. Hierzu wurden gleiche Teile (10 g) abgewogen und ein Teil direkt, ein anderer Teil nach dem Braten analysiert. Zum Vergleich wurde mit Muskel- und Leberproben von Kontrolltieren in derselben Weise verfahren.

Ergebnisse

Der DNC-Gehalt wurde lediglich in der Leber durch den Bratprozeß geringfügig (10 - 15 %) vermindert; beim Muskel konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

D. DISKUSSIONSBEMERKUNGEN ZUR FRAGE DER HYGIENISCHEN UNBEDENKLICHKEIT DER COCCIDIOSTATICAANWENDUNG.

Die vorgelegten Versuchsergebnisse bestätigen die Angaben der Literatur, nach denen Nitrofurazon, Nitrophenid und Nicarbazin, mit dem Futter in den empfohlenen Dosen von 6,7 , 20,0 bzw. 12,5 mg % verabreicht, auf Küken und Junghühner keinen schädlichen Einfluß ausüben.

Weiterhin ist nach den Untersuchungen von BRONSCH und NIESAR in unserem Institut weder Nitrofurazon noch Nitrophenid jenseits der Darmwand - also in den Organen der Küken und Hühner nachzuweisen. Dieser Befund würde für die ernährungshygienische Unbedenklichkeit dieser beiden Coccidiostatica sprechen. Bei der Betrachtung der Nicarbazinsrückstände in den Geweben könnten dagegen hinsichtlich der Novelle zum Lebensmittelgesetz (B.G.Bl. I, S. 950 vom 21. 12. 1951) Bedenken auftauchen, die den Einsatz dieses Coccidiostatikums nicht gerechtfertigt erscheinen lassen. Allein die sich aus unseren Versuchen eindeutig ergebende Tatsache, daß die Toxizität des Nitrofurazons und des Nitrophenids größer ist als diejenige des Nicarbazins, bei dessen Verfütterung in keinem Falle Todesfälle auftraten, kann nicht anders erklärt werden als durch Resorption toxischer Abbauprodukte dieser Verbindungen, die mit den angewendeten Bestimmungsverfahren nicht mehr erfaßbar sind. Im Hinblick auf das Nitrofurazon ist nach Versuchen von BRONSCH damit zu rechnen, daß die gesamte zugeführte Menge durch die Intestinal-Mikroben - wahrscheinlich zum entsprechenden Aminofurazon - reduziert wird. Diese Substanz ist mit dem zum Nachweis von Nitrofurazon allgemein verwendeten Verfahren, das auf dem Nachweis der Nitrogruppe basiert, nicht mehr bestimmbar. Beim Nitrophenid könnte eine entsprechende mikrobielle Reduktion der Nitrogruppen erfolgen. Die entstehende Diaminoverbindung würde dann nach der Resorption in den Geweben erscheinen, aber der Bestimmung entgehen.

Das Dinitrocarbanilid (fettlösliche Komponente des Nicarbazins) wird dagegen anscheinend nicht bzw. nicht in dem Umfang von den Darmmikroben reduziert und ist daher nach der Resorption als solches in den Organen der Versuchstiere nachweisbar.

Aus diesen Überlegungen ergibt sich, daß die Frage nach der ernährungshygienischen Unbedenklichkeit der Coccidiostatikaanwendung für alle drei hier zur Diskussion stehenden Verbindungen in gleicher Weise zu stellen ist, und zwar müssen, so lange die Konzentrationen evt.

auftretender Abbauprodukte in den Geweben nicht bekannt sind, die gefundenen Nicarbazinrückstände als Diskussionsbasis herangezogen werden.

Insgesamt läßt sich nach unseren Analysenergebnissen eine Menge von 1,3 mg Dinitrocarbanilid und 3,2 mg Hydroxydimethylpyrimidin errechnen, die ein bis zum Schlachttage mit 125 mg pro kg Kükenalleinfutter gefüttertes Masthähnchen enthalten kann. Diese Menge bleibt nach eigenen Befunden auch bei der küchenmäßigen Zubereitung erhalten.

Bei einem angenommenen, unverhältnismäßig hohen Geflügelfleischverzehr von einem halben Hähnchen pro Kopf und Tag verteilt sich eine Menge von

$$\frac{1,3 + 3,2}{2} = 2,5 \text{ mg}$$

Nicarbazinrückstand auf das Körpergewicht eines Erwachsenen von 70 kg. Hieraus ergibt sich eine Belastung des Menschen mit NC - Rückständen von 35 ~~g~~ / kg Körpergewicht.

Um die mögliche Auswirkung dieser Belastung für den Menschen beurteilen zu können, müssen die von OTT u. M. (39) für das NC erarbeiteten toxikologischen Daten diesem Ergebnis gegenübergestellt werden. Die akute Toxizität (LD_{50}) wird für das Huhn mit 2,4 g / kg Körpergewicht, für größere Säugetiere (Hund und Katze) mit 5 g / kg Körpergewicht angegeben. Das Huhn ist als das gegenüber dem NC am empfindlichsten reagierende Tier anzusehen. Das geht auch aus der "Dosis maximatollerata" hervor, die ebenfalls von OTT u. a. ermittelt wurde. Sie liegt für Geflügel zwischen 30 und 80 mg und bei Säugetieren (Schaf, Kalb, Schwein) zwischen 100 und 200 mg NC / kg Körpergewicht. Durch diesen Befund, daß das Huhn empfindlicher als das Säugetier auf NC reagiert und nicht umgekehrt, wird die Abschätzung der toxikologischen Bedeutung von NC-Rückständen für den Menschen als seinen Konsumenten wesentlich erleichtert.

Für die toxikologische Beurteilung von NC-Rückständen ist weiterhin die Tatsache wichtig, daß es nicht zu einer Kumulation der aus NC entstehenden Spaltprodukte DNC und HDP im Gewebe kommt. Als Beweis können wir nach unseren Ergebnissen anführen, daß sich mit steigenden NC-Konzentrationen im Futter (125, 250 und 625 mg / kg Futter) auch steigende Rückstände an DNC und HDP im Gewebe ergaben, die aber nicht in Abhängigkeit von der Fütterungszeit standen. Analysen wurden 14, 28, 42 und 56 Tage nach Fütterungsbeginn im Gewebe durchgeführt.

Außerdem war das Gewebe zwei Tage nach dem Absetzen des NC-haltigen Futters praktisch rückstandsfrei. Bei einer Kumulation der Spaltprodukte DNC und HDP hätte mit fortschreitender Fütterung ein kontinuierliches Ansteigen derselben beobachtet werden müssen. Sie stellen sich aber auf ein, zwar von der NC-Konzentration des Futters abhängiges, aber dann nach wenigen Tagen bis Versuchsende gleichbleibendes Niveau ein, was nur über eine gleichzeitig ansteigende Ausscheidungsrate der Spaltprodukte in Faeces und / oder Harn bzw. durch einen Umbau der Molekülteile DNC und HDP in analytisch nicht mehr faßbare Verbindungen erklärt werden kann.

Gegen die letzterwähnte Möglichkeit spricht das von uns in vitro nachgewiesene geringe Abbauvermögen der Leber für NC. Es muß hier allerdings, wie schon oben erwähnt wurde, die reduzierende Kraft der Darmflora mit berücksichtigt werden. Aber auch die schnell abklingende Radioaktivität (Versuch mit C_{14} -markiertem DNC) 1 - 2 Tage nach dem Absetzen der NC-Zufütterung spricht gegen den intermediären Umbau und unterstützt die Auffassung von der schnelleren Ausscheidung des DNC-Anteils (55).

Schließlich läßt sich noch unter Berücksichtigung der für verschiedene Säugetierarten gefundenen maximalen Toleranzdosis, die zwischen 100 und 200 mg NC/kg Körpergewicht liegt, der sogenannte "Sicherheitsfaktor" errechnen. Wir hatten aus unseren Analysenergebnissen abgeleitet, daß ein menschlicher Organismus beim täglichen Verzehr eines halben Hähnchens maximal 35 μ g NC/kg Körpergewicht aufnimmt. Daraus errechnet sich der Sicherheitsfaktor zu

$$\frac{100}{0,035} \quad \text{bzw.} \quad \frac{200}{0,035} \quad = \quad 2850 - 5700.$$

Dieser ist weitaus größer als er für Lebensmittelzusätze mit 100 empfohlen wird. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der dieser Berechnung zugrunde gelegte Verzehr von einem halben Hähnchen pro Kopf und Tag nach der vorliegenden Statistik um etwa 1 1/2 Zehnerpotenzen zu hoch veranschlagt ist.

Wenn man die hier angestellten Überlegungen und Berechnungen abschließend beurteilt und zusätzlich bedenkt, daß dem Tierhalter die Auflage gemacht wird, die Coccidiostatica-Zufütterung 4 Tage vor der Schlachtung abubrechen, so kann eine Gefährdung des Menschen als ausgeschlossen gelten. Nach unseren Versuchen sind nämlich schon nach 2-tägiger Kontrollfüttergabe - auch nach Verfütterung hoher NC-Dosen (125 mg % im Futter) - keine Rückstände mehr im Gewebe vorhanden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Toxizität der Coccidiostatica NITROFURAZON, NITROPHENID und NICARBAZIN anhand der Wachstumsbeeinflussung, dem Auftreten klinischer Erscheinungen und mit Hilfe histologischer Untersuchungen ermittelt. Außerdem wurden die Rückstände von Nicarbazin in Muskel, Leber, Darm und Niere bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich folgendermaßen kurz zusammenfassen:

1. Eine Wachstumsbeeinflussung durch die empfohlenen Dosen von 6,7 mg % für Nitrofurazon, von 20,0 mg % für Nitrophenid und von 12,5 mg % für Nicarbazin konnte nicht nachgewiesen werden.
2. Wachstumsdepressionen traten auf, wenn die Dosierungen über 3 - 4 Wochen für Nitrofurazon auf 33,5 mg %, für Nitrophenid auf 40,0 mg % und für Nicarbazin auf 62,5 mg % erhöht wurden.
3. Eine Dosis von 67,5 mg % Nitrofurazon (über 21 Tage zugeführt) und von 200 mg % Nitrophenid (über 9 Tage verabreicht) erwiesen sich bei dem Kükenversuch als letal. Bei dem Jungtierversuch waren eine Dosis von 135,0 mg % Nitrofurazon nach 14 Tagen letal. Dagegen führte die Verabreichung der höchsten Dosis von Nicarbazin weder beim Kükenversuch (62,5 mg % NC im Futter) noch beim Jungtierversuch (125,0 mg % NC im Futter) zu Todesfällen.
4. Durch Rückstandsbestimmungen bei den Tieren, die Nicarbazin erhalten hatten, konnte sowohl die Dinitrocarbanilid-Komponente als auch die Hydroxydimethylpyrimidin-Komponente in Muskel, Leber, Niere und Darm nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze für DNC liegt bei 1 µg, diejenige für HDP bei 2 µg/g Frischgewicht.
5. Durch Schlachtung einzelner Tiere in 14-tägigem Abstand aus den verschiedenen Nicarbazin-Gruppen wurde festgestellt, daß keine Kumulation der einzelnen Komponenten im Gewebe eintritt.
6. Der in Muskel und Leber gefundene Gehalt wird durch 24-stündige Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C oder durch Tiefgefrieren über 8 - 14 Tage nicht verändert.
7. Das Abbauvermögen von Muskel und Leber für Nicarbazin ist gering.
8. Durch den Bratprozeß wird der DNC-Gehalt im Muskel nicht vermindert, der DNC-Gehalt in der Leber nimmt nur geringfügig ab.
9. Bei allen Tieren, die 2 Tage Kontrollfutter (ohne Nicarbazin) erhalten hatten, konnte weder DNC noch HDP nachgewiesen werden. Die Muskulatur war bereits 24 Stunden nach dem Absetzen des nicarbazin-haltigen Futters frei von DNC.

- 19 Jungherr, E. 1953, Proc. 15th Intern. Vet. Cong. Stockholm; 243
- 20 Krantz, J.D., 1945, Jour. of Pharmac. 85, 324
Evans, W.E. jun.
- 21 Kuhn, Persönliche Mitteilung
Fa. Böhringer & Söhne
- 22 Cyanamid Prospekte American Cyanamid Company Product Bulletin Megasul 1956
- 23 Lucas, W.C., 1949, Univer. of Delavare Agricult. Exper. Station Bulletin No.280;S.3;
Tomhave,A.E.,
Seeger, K.C.
- 24 Valetzky, E., 1949, Ann. N.Y. Acad. Sci.; 52, 543
Hughes, C.O.,
Brandt, M.C.
- 25 Seeger, K. 1950, Broiler Growing, 1, 24, 42
- 26 Willems, A., 1955, Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 5, 24
Vanschoubrock, F.,
Vercruyse
- 27 Kanergis 1955, Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 5, 24
- 28 Brackett, S., 1949, Ann. N.Y. Academ. Sci.;
Bliznick, A. 52, 595
- 29 Mayer, E. Zit. nach Valetzky (34)
- 30 Newberne, P.M., 1956, Poultry Sci.; 35, 1044
Dogle, H.C.
- 31 Cyanamid-Company Technical Bulletin of Nitrophenide
- 32 Lichtfield, I.T., Zit. nach Cyanamid-Company (42)
Alonso, L.G. und
Ash
- 33 Cuckler, A.D., 1955, Sci.; 122, 244
Malanga, C.M.,
Basso, A.J. and
O' Neil
- 34 Merck Sharp and Service Bulletin of Nicarbazin,
Dohme Company Internat. Div. of Merck and Co.,
161 Avenues of the Amerik. N.Y 13,
N.Y. USA

- 35 Cuckler, A.C.,
Malanga, C.M. 1955, Jour. of Parasit. 41, 302
- 36 Cuckler, A.C.,
Malanga, C.M.,
Ott, W.H. 1956, Poultry Sci.; 35, 98
- 37 Siegmann, O., Prüfungsbericht über Nicarbazin
aus der Bundesanstalt für Klein-
tierzucht, Celle 1957
- 38 Barber, C.W. 1955, Cornell. Vet. 45, 360
- 39 Ott, W.H.,
Kuna, S.,
Porter, C.C.,
Cuckler, A.C.
Fogg, D.E. 1956 Poultry Sci.; 35, 1355
- 40 Ott, W.H.,
Cobb, W.R.,
Cuckler, A.D. 1958, Poultry Sci.; 37, 909
- 41 Mushett, C.W.,
Washko, F.V.,
Kelley, K.L. and
Bloom, A.I. 1958, Poultry Sci.; 37, 580
- 42 Newberne, P.M. and
Buck, W.B. 1957, Poultry Sci.; 36, 304
- 43 Rubin, R.,
Mc Loughlin, D.K.
Costello, L.C.
Wehr, E.E. 1956, Poultry Sci.; 35, 956
- 44 Mc. Clary, C.F. 1955, Poultry Sci.; 34, 1164
- 45 Schwarz., L.,
Deckert, W., 1959, Archiv für Geflügelkun-
de, 39, 61
- 46 Baker, R.C.,
Hill, R.W.,
van Tienhoven A.,
Bruckner, J.H. 1957, Poultry Sci.; 36, 718
- 47 Polin, D.,
Ott, W.H.,
Zeissig, A. 1958, Poultry Sci.; 37, 898

- 49 Weiss, H.S., 1957, Poultry Sci.; 36 589
- 50 Mc Loughlin, D.K., 1957, Poultry Sci.; 36, 880
Wehr, E.E.,
Rubin, R.,
- 51 Tienhoven van, A.. 1958, Poultry Sci.; 37, 129
Hill, F.W.,
Prock, A.,
Baker, R.C.
- 52 Tienhoven van A., 1957, Poultry Sci.; 36, 760
Crowfort, R.D.,
Duchaine, S.A.
- 53 Polin, D., 1956, Poultry Sci.; 35, 1376
Gilfillan, J.L.,
Ott, W.H.,
Porter, C.C.
- 54 Porter, C.C., 1955, Poultry Sci.; 34, 995
Gilfillan, J.L.
- 55 Clark, R., 1956, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
Geoffrey, R., 91, 4
Gilfillan, J.L.,
Porter, C.C.
- 56 Gylstorff, I. 1959, Archiv für Geflügelkunde; 1;
- 57 Schoop, G., Wagner, KH. 1954, Vet. med. Nachrichten; 4, 237;
Minners, P.
- 58 Evans, J. 1893, Jour. of practical Chemistry;
48; 497
- 59 Kuna, S. Zit. nach Poultry Sci. 34, 995
(1955)

Zum Schluß meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. Johannes Brügge mann meinen besonderen Dank für die Überlassung des Themas aussprechen.

Ebenso gilt mein Dank dem Pathologischen Institut für die durchgeführten histologischen Untersuchungen.

Weiterhin bedanke ich mich sehr bei Herrn Priv. Doz. Dr. Bronsch, den Herren Assistenten Dr. Schöle und Dr. Niesar für die freundliche Unterstützung.

G. LEBENSLAUF

Am 30. 6. 1934 wurde ich als Sohn des Bauern Edmund Schwarz und dessen Ehefrau Hedwig, geb. Krinner, in Salching geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Salchin trat ich in das humanistische Gymnasium in Metten über. Im Sommer 1953 erhielt ich das Reifezeugnis.

Im Wintersemester 1953/54 nahm ich das Studium der Tiermedizin an der Universität München auf, das ich im August 1958 mit dem tierärztlichen Staatsexamen abschloß.

Vom 1. Februar 1959 bis 1. Mai 1959 war ich am Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München beschäftigt. Seit September 1959 bin ich als Veterinärpraktikant und Assistent tätig.

